تأثیر طیف‌های مختلف نور LED بر سرعت رشد، میزان بیوماس و تولید رنگ‌دانه در قارچ موناسکوس پورپورئوس

عاطفه باخرد؛ مجید عزیزی

دانشگاه فردوسی مشهد

DOI: 10.22067/jhs.2021.59962.0

چکیده

ظرفیت برای درک و پاسخ به نور در حیوانات، گیاهان، قارچ‌ها و باکتری‌ها گسترده است. نور یکی از مهم‌ترین سیگنال‌های زیست‌محیطی برای توسعه و گسترش فرایندهای فیزیولوژیکی در موجودات ازجمله قارچ‌ها است. در این پژوهش تأثیر کیفیت نور بر سرعت رشد، بیوماس و عملکرد رنگ‌دانه در قارچ موناسکوس تحت شرایط تاریکی و ۳ طیف نور LED سفید، قرمز و آبی بررسی گردید. مقدار رنگ‌دانه در روزهای هفتم، دهم و چهاردهم اندازه‌گیری شد. طرح آزمایش به‌صورت فاکتوریل اسپلیت پلات در زمان با ۶ تکرار بود. برای اندازه‌گیری سرعت رشد شعاعی و وزن زیست‌توده از محیط جامد استفاده گردید. مقدار رنگ‌دانه‌ها با استفاده از اسپکروفتومتر اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که بین مقدار رنگ‌دانه و طیف‌های مختلف نوری رابطه معنی‌داری وجود دارد و بیشترین مقدار رنگ‌دانه‌های زرد، نارنجی، قرمز (به ترتیب ۰،۰۳۴۴، ۰،۰۲۹۱، ۰،۰۲۴۹) در شرایط تاریکی به دست آمد، اما بین زمان برداشت و مقدار رنگ‌دانه به‌جز برای رنگ‌دانه قرمز در روز دهم در شرایط تاریکی، با مقدار ۰،۰۲۴۹، تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. کمترین مقدار رنگ‌دانه نیز مربوط به رنگ‌دانه قرمز تولیدشده در روز چهاردهم در نور آبی با مقدار جذب ۰،۰۰۰۹ بدست آمد. همچنین بیشترین رشد شعاعی در محیط جامد در شرایط تاریکی (۵،۱۲ میلی‌متر در روز) و کمترین رشد شعاعی در نوری آبی (۲،۶۱ میلی‌متر در روز) مشاهده شد؛ اما بین مقدار زیست‌توده و نور در محیط جامد تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. بیشترین مقدار بیوماس در محیط مایع ۰،۰۱۲۶ گرم در ۴۰ میلی‌لیتر محیط کشت در شرایط تاریکی در روز چهاردهم و کمترین مقدار بیوماس نیز با مقدار ۰،۰۰۶۸ گرم در ۴۰ میلی‌لیتر محیط کشت در نور سفید در روز هفتم به دست آمد.

کلیدواژه: بیوماس، رنگ‌دانه، سرعت رشد شعاعی، موناسکوس پورپورئوس، نور

مقدمه: جنس موناسکوس[1] متعلق به خانواده موناسکاسه[2] است (۲۲). اما براساس توالی‌یابی ژنوم آن که اخیراً انجام شده ، به نظر می‌رسد که این جنس ارتباط نزدیکی با جنس آسپرژیلوس دارد و بنابراین باید در طبقه‌بندی خانواده آسپرژیلاسه[3] قرار گیرد (۷).

این جنس شامل ۹ گونه است که مهم‌ترین آن‌ها موناسکوس پیلوسوس[4]، موناسکوس رابر[5] و موناسکوس پورپورئوس[6] هستند که موناسکوس پورپورئوس معروف‌ترین گونه این قارچ است. گونه‌های موناسکوس از قارچ‌های خوراکی سنتی در شرق آسیا به شمار می‌روند و به خاطر توانایی آن‌ها در تولید متابولیت‌های ثانویه مانند موناکولین‌ها، رنگ‌دانه‌های موناسکوس، Y–آمینو بوتیریک اسید و غیره بسیار مشهور هستند. در میان این متابولیت‌ها، رنگ‌دانه‌ها از اهمیت بیشتری برخوردار هستند و نزدیک به دو هزار سال است که به‌طور گسترده به‌عنوان رنگدهنده غذا مورداستفاده قرار می‌گیرند (۶،۲۵).

علاوه بر این، رنگ‌دانه‌ها دارای طیف وسیعی از فعالیت‌های بیولوژیکی، مانند خواص ضد جهش و ضد سرطان، فعالیت‌های ضد میکروبی و ویژگی‌های بالقوه ضد قارچی هستند و از آن‌ها حتی برای رنگ‌آمیزی و رنگ‌رزی الیاف کتان و چرم، حساس کردن سلول‌های خورشیدی و ساختن ژل‌ها نیز استفاده می‌شود (۶).

رنگ‌دانه‌های موناسکوس ترکیبات آزافیلونی[7] هستند که سه نوع کلی از این ترکیبات معمولاً شامل زرد، نارنجی و قرمز است، حتی گاهی اوقات شرایط کشت گونه‌های موناسکوس ممکن است بر ترکیبات رنگ‌دانه‌ها تأثیر بگذارند (۵،۱۱،۲۷). تا سال ۱۹۷۳، شش ترکیب از رنگ‌دانه‌های موناسکوس ازجمله دو رنگ‌دانه زرد، موناسین[8](۳،۲۱) و آنکافلاوین[9](۱۵)؛ دو رنگ‌دانه نارنجی، رابروپانکتاتین[10](۳) و موناسکوروبین[11](۱۵) و دو رنگ‌دانه قرمز رابروپانکتامین[12] و موناسکوروبرامین[13] (۱۰،۲۳) شناسایی شدند که به‌عنوان ترکیبات اصلی رنگ‌دانه‌های موناسکوس شناخته می‌شوند

[1] Monascus
[2] Monascaceae
[3] Aspergillaceae
[4] *M. pilosus*
[5] *M. ruber*
[6] *M. purpureus*
[7] Azaphilone
[8] Monascin
[9] Ankaflavin
[10] Rubropunctatin
[11] Monascorubrin
[12] Rubropunctamine
[13] Monascorubramine

(۹،۱۲،۱۹). امروزه، به دلیل فعالیت‌های مختلف بیولوژیکی رنگ‌دانه‌های موناسکوس، توجه بسیار بیشتری بر این ترکیبات می‌شود. همچنین، این قارچ به‌عنوان برنج قرمز مخمری (RYR)[1]، کوجی و یا آنکاک[2] نیز شناخته می‌شود. آنکاک درنتیجه تخمیر برنج توسط گونه‌های موناسکوس تولید می‌شود و طی چندین دهه، در کره، ژاپن و چین برای پیشگیری و درمان اختلالات متابولیت به‌عنوان غذای دارویی رایج استفاده می‌شد (۱۹،۸).

توانایی احساس و پاسخ به نور در گونه‌های مختلف، ازجمله حیوانات، گیاهان، قارچ‌ها و باکتری‌ها گسترده است (۲۴). بیشتر مطالعات بررسی اثر تیمارهای مختلف نوری در قارچ‌ها، بر روی قارچ های نوروسپورا کراسا[3]و آسپرژیلوس نیدولانس[4] متمرکزشده اند و بیان می‌کنند که این تیمارها می‌توانند سبب القاء و یا بازداری از رشد و تولید متابولیت های ثانویه شوند (۲۰،۲۶). در نوروسپورا کراسا مشاهده‌شده است که نور آبی دوره‌های شبانه‌روزی و فرایندهای دیگر مانند سنتز کاروتنوئید ها، تشکیل اسپور و نورگرایی را تنظیم می‌کند (۱۳،۱۴).

میاک و همکاران (۱۷)، مشاهده کردند که اندازه کلنی در قارچ موناسکوس پیلوس[5] در محیط جامد تحت وضعیت‌های مختلف نوری و تاریکی تغییر نمی‌کند، اما کنیدیوفورها در مسیلیوم زیر نور قرمز، کوتاه‌تر بودند و رشد منسجم‌تری در مقایسه با تاریکی داشتند، همچنین کنیدیوفورهای رشد کرده زیر نور آبی بسیار طویل‌تر و سست‌تر از کنیدی‌های رشد یافته در تاریکی بودند.، و همچنین نور به طور قابل توجهی سبب تحریک تشکیل اسپور نیز شده بود. اگرچه نور قرمز در مقایسه با نور آبی سبب افزایش تعداد و میزان آسکی شد ولی جوانه‌زنی کنیدیا در زیر نور آبی نسبت به نور قرمز بیشتر تحریک شده بود، این مشاهدات نشان می‌دهد موناسکوس پیلوس قادر به حس و تفاوت بین نور قرمز و آبی است و واکنش خود را با الگوهای متفاوتی از گسترش مسیلیوم و تشکیل اسپور نشان می‌دهد. آنها همچنین مشاهده کردند که نور قرمز تولید متابولیت‌های ثانویه را در قارچ موناسکوس تحریک می‌کند، درحالی‌که نور آبی فقط تولید گاما بوتیریک اسید[6] را افزایش می‌دهد (۱۷).

بابیتها و همکاران (۱) در آزمایش خود از کاغذهای شیشه ای رنگی که فقط اجازه عبور رنگ خاصی از نور را می دهد و رنگ‌های دیگر را فیلتر می کند به عنوان پوشش ویال‌های شیشه ای خود استفاده کرده و یک لامپ صد وات را به عنوان منبع نوری در نظر گرفتند، آنها گزارش کردند که تابش نور مستقیم آبی به‌طورکلی تولید رنگ‌دانه را در موناسکوس پورپورئوس سرکوب می‌کند.

چانگ لو و همکاران (۲) در مطالعات خود نشان دادند که نور آبی با شدت کم و زمان روشنایی مناسب (۱۰۰ لوکس؛ ۳۰ دقیقه در روز، ۲۰۰ لوکس؛ ۱۵ دقیقه در روز) تولید موناسین و آنکافلاوین را افزایش می‌دهد؛ اما با شدت نور بالا (۳۰۰ و ۴۵۰ لوکس) و زمان در معرض قرار گرفتن (۴۵ تا ۶۰ دقیقه) تولید رنگ‌دانه کاهش می‌یابد. آن‌ها بر این باورند که نور آبی ممکن است تولید رنگ‌دانه را مهار یا تحریک کند؛ تأثیر نور آبی به‌شدت نور، زمان روشنایی و نوع گونه قارچ بستگی دارد.

[1] Red yeast rice
[2] Angkak
[3] Neurospora crassa
[4] *Aspergillus nidulans*
[5] M.pilus
[6] Gamma butyric acid

هدف از این پژوهش تأثیر نورهای مختلف LED (قرمز، سفید، آبی و شرایط تاریکی) و زمان برداشت قارچ (روزهای ۷، ۱۰، ۱۴) بر مقدار رنگ‌دانه‌های زرد، نارنجی و قرمز، در محیط مایع و بیوماس سلولی و سرعت رشد کلنی در محیط جامد در قارچ موناسکوس پورپورئوس است.

مواد و روش‌ها:

این آزمایش در سال ۱۳۹۵ در آزمایشگاه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد انجام شده است. سویه ۵۳۰۳ قارچ موناسکوس پورپورئوس از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران[1] خریداری شد.

تهیه محیط کشت

محیط کشت جامد

به‌منظور بررسی سرعت رشد قارچ در شرایط نوری مختلف و همچنین تاریکی، یک قطعه به قطر ۵ میلی‌متر از محیط کشت مادری به مرکز پلیت حاوی محیط کشت PDA[2] منتقل شد. پلیت‌های حاوی قارچ، پس از کشت، به شرایط تاریکی و جعبه‌های حاوی لامپ LED (قرمز، آبی، سفید) (شکل ۱) منتقل و به مدت ۱۴ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد گذاشته شدند.

شکل ۱. کشت های جامد قارچ موناسکوس پورپورئوس **در جعبه‌های حاوی لامپ‌های LED قرمز، سفید و آبی**

Figure 1. Solid cultures *of Monascus purpureus* in boxes containing red, white and blue LED lamps

[1] IROST
[2] Potato dextrose agar

محیط کشت مایع

به‌منظور اندازه‌گیری مقدار رنگ‌دانه‌ها (زرد، نارنجی و قرمز) از کشت محیط مایع GYP (گلوکز ۴۰ g/l ، پپتون ۵ g/l، عصاره مخمر۱۰ g/l) استفاده شد. یک قطعه به قطر ۵ میلی‌متر از کشت جامد مادری قارچ به ویال های حاوی ۴۰ میلی‌لیتر محیط GYP منتقل و تحت شرایط نوری (قرمز، آبی، سفید) و تاریکی در شیکر انکوباتور با دور ۱۲۰ rpm به مدت ۱۴ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند.

شرایط نوری

برای ایجاد شرایط نوری برای رشد قارچ، جعبه‌هایی با طول و عرض ۳۰ و ارتفاع ۲۰ سانتیمتر ساخته شد و درون هرکدام از این جعبه‌ها ۹ لامپ LED یک وات با طیف خاص (قرمز، آبی و سفید) قرار گرفتند، جعبه بدون لامپ نیز به‌عنوان شرایط تاریکی در نظر گرفته شد و برای جلوگیری از ورود نور به‌طور کامل با پوشش مشکی پوشانده شد.

تخمین رشد قارچ در محیط جامد

برای تخمین رشد قارچ، ۲ عامل سرعت رشد شعاعی و وزن خشک سلول در نظر گرفته و اندازه‌گیری شدند. برای اندازه‌گیری سرعت رشد شعاعی قارچ، هردو روز یک‌بار، قطر هر کلنی قارچ رشد کرده در پتری دیش در ۲ محور عمود برهم به کمک کولیس اندازه‌گیری و میانگین قطر کلنی‌هایی که در ۲ محور عمود بر هم اندازه‌گیری شده، به‌عنوان قطر کلنی در نظر گرفته شدند.

به‌منظور اندازه‌گیری وزن زیست‌توده پس از چهارده روز، هر پلیت در بشر سترون ریخته و به آن پانزده میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد. سپس محیط جوشانده شده تا زیست‌توده از آگار جدا شود، درنهایت محیط حاوی زیست‌توده با کاغذ صافی صاف‌شده و میسیلیوم‌های باقی‌مانده بر روی کاغذ صافی با آب مقطر شسته و سپس در آون، با دمای شصت درجه سانتی‌گراد به مدت بیست و چهار ساعت و یا بیشتر (تا زمانی که وزن زیست‌توده ثابت شود) خشک شدند (۱۶). وزن میسیلیوم‌ها توسط ترازوی مدل FH-303B با دقت یک هزارم گرم اندازه‌گیری شد.

تخمین زیست‌توده در محیط مایع

در روزهای ۷، ۱۰ و ۱۴ پس از کشت، محیط کشت قارچ توسط کاغذ صافی صاف‌شده، میسیلیوم‌های باقی مانده بر روی کاغذ صافی با آب مقطر شسته و پس از آن به مدت ۲ روز در فریزدرایر خشک شدند. پس از خشک شدن وزن زیست‌توده اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری مقدار جذب رنگ‌دانه‌ها

محیط کشت مایع عبور کرده از کاغذ صافی برای آنالیز رنگ‌دانه مورد استفاده قرار گرفت. به این صورت که ده میلی‌لیتر محیط برداشته شده با ده میلی‌لیتر اتیل استات که طبق برخی مقاله‌ها بهترین حلال برای متابولیت های ثانویه است مخلوط و سپس با دور ۲۰۰ rpm به مدت ۲ ساعت تکان داده شدند، پس‌ازآن با دور ۴۵۰۰ rpm سانتریفیوژشده و مایع رویی جدا شد، این مایع در بالن ریخته شده و در روتاری اوپورایتور[1] با دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا حلال آن تبخیر شود، مواد رسوب کرده در بالن با ۳ میلی‌لیتر متانول جمع‌آوری و با دستگاه اسپکتروفتومتر آنالیز شد.

اندازه‌گیری جذب نمونه‌ها در طول‌موج‌های ۴۱۰ نانومتر برای رنگ‌دانه زرد، ۴۷۰ نانومتر برای رنگ‌دانه نارنجی و ۵۱۰ نانومتر برای رنگ‌دانه قرمز صورت گرفت(۱۸).

طرح آماری و آنالیز داده‌ها

طرح آزمایش به‌صورت فاکتوریل اسپلیت پلات در زمان در ۶ تکرار و آنالیز داده‌ها توسط نرم‌افزار جامپ[2] انجام شد.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس برای صفات مختلف (مقدار رنگ‌دانه‌ها و مقدار بیوماس سلولی) در محیط مایع در جدول ۱ و سرعت رشد کلنی در محیط جامد در جدول ۲ آورده شده است.

جدول ۱. نتایج آنالیز واریانس (میانگین مربعات) صفات تحت تأثیر تیمارهای مختلف نور LED و زمان برداشت در قارچ موناسکوس پورپورئوس

Table 1. ANOVA (mean square) of traits under the influence of different treatments of different LED light and harvesting time in *Monascus purpureus*

منبع تغییرات SV	درجه آزادی DF	جذب رنگ‌دانه زرد Yellow pig (nm)۴۱۰	جذب رنگ‌دانه نارنجی Orange pig (nm)۴۷۰	جذب رنگ‌دانه قرمز Red pig (nm)۵۱۰	جذب رنگ‌دانه کل Total pig (nm)	زیست‌توده در محیط مایع Biomass in broth
تکرار Replication	۱۵	0.014^{ns}	0.012^{ns}	0.005^{ns}	0.081^{ns}	0.0008^{ns}
نور Light	۳	0.128^{*}	0.070^{*}	0.053^{*}	0.723^{**}	0.0064^{*}
زمان Time	۲	0.0065^{ns}	0.022^{ns}	0.019^{**}	0.133^{ns}	0.0018^{ns}

[1] Rotary evaporator
[2] JMP

نور× زمان Light × Time	۶	0.014^{ns}	0.024^{ns}	0.017^{*}	0.144^{ns}	0.0005^{ns}
خطا Error	۴۵	0.015	0.011	0.004	0.078	0.0006

**معنی‌دار در سطح ۱ درصد، *معنی‌دار در سطح ۵ در صد، ns غیر معنی‌دار

** significant at ≤0.01; *significant at ≤0.05; ns: no significant

جدول ۲. نتایج آنالیز واریانس (میانگین مربعات) سرعت رشد کلنی تحت تأثیر تیمارهای مختلف نور LED در قارچ موناسکوس پورپورئوس

Table 2. ANOVA (mean square) of colony growth rate under the influence of different treatments of different LED light in *Monascus* purpureus

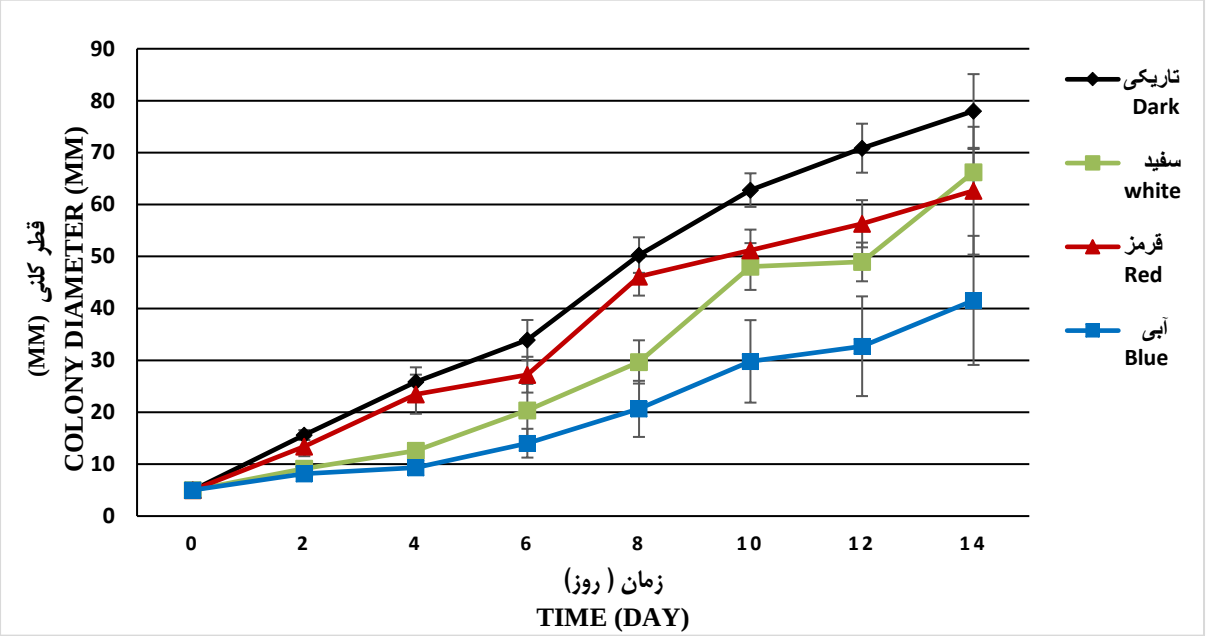
منبع تغییرات SV	درجه آزادی DF	سرعت رشد کلنی در محیط جامد Growth rate in solid medium
تکرار Replication	16	7.440^{ns}
نور Light	۳	2256.35^{**}
زمان Time	7	5269.69^{**}
نور× زمان Light× Time	21	127.244^{**}
خطا Error	48	5.258

**معنی‌دار در سطح ۱ در صد،، ns غیر معنی‌دار

** significant at ≤0.01; ns: no significant

سرعت رشد کلنی در محیط جامد: همان‌طور که در جدول شماره ۲ مربوط به تجزیه واریانس مشخص است بین سرعت رشد کلنی و نور، سرعت رشد کلنی و زمان و سرعت رشد کلنی و رابطه متقابل نور و زمان در سطح ۱ درصد رابطه معنی‌داری وجود دارد. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده، بیشترین میزان رشد شعاعی در محیط تاریکی با میانگین رشد ۵،۱۲ میلی‌متر در روز به دست آمد، درحالی‌که کمترین میزان رشد شعاعی مربوط به طیف نوری آبی با میانگین رشد ۲،۶۱ میلی‌متر در روز بود. نکته قابل‌توجه این است که در طیف نوری سفید از روز ۱۲ تا

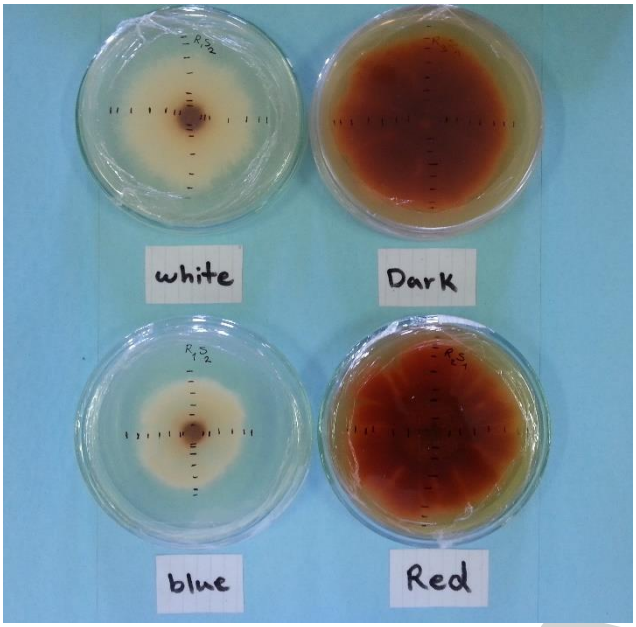
۱۴ سرعت رشد به‌صورت جهشی افزایش پیداکرده و در طی دو روز مقدار آن از سرعت رشد در طیف نوری قرمز بیشتر شده است که در مورد علت آن احتیاج به مطالعات و آزمایشات بیشتری است (شکل ۲).



شکل ۲. سرعت رشد کلنی قارچ موناسکوس پورپورئوس در طیف‌های مختلف نوری در محیط جامد

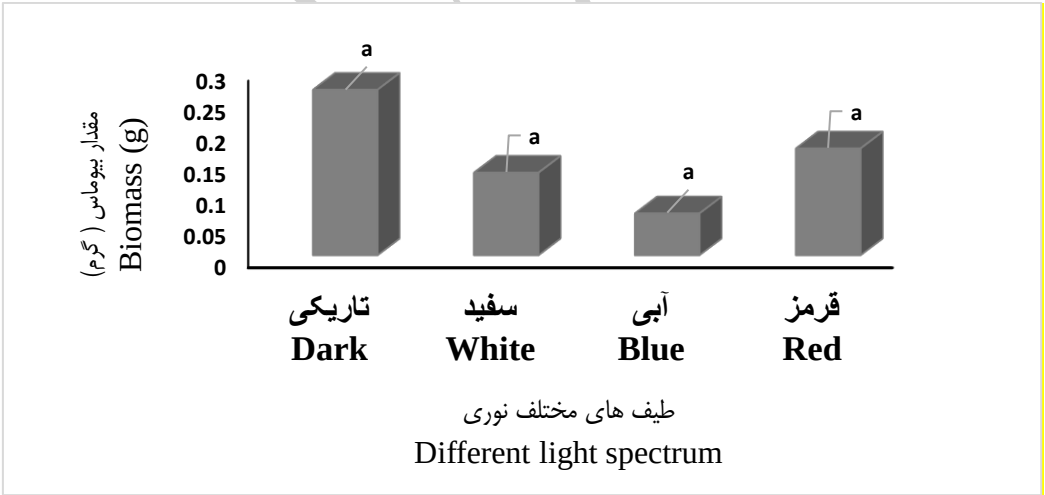
Figure 2. Growth rate of *Monascus purpureus* colonies in different spectra of light on solid medium

مقایسه میزان تولید زیست‌توده در طیف‌های مختلف نوری در محیط جامد: اگرچه نتایج تجزیه واریانس نشان می‌دهد که بین طیف‌های مختلف نور و مقدار بیوماس بعد از ۱۴ روز تفاوت معنی‌داری وجود ندارد، بااین‌حال شرایط تاریکی باعث افزایش مقدار زیست توده سلولی نسبت به سایر تیمارها شده است، قرار گرفتن در نور آبی باعث کاهش رشد سلولی و کاهش وزن زیست‌توده گردید (شکل ۲).



شکل ۳. پلیت‌های حاوی قارچ موناسکوس روی محیط PDA، کشت شده در طیف‌های نوری مختلف

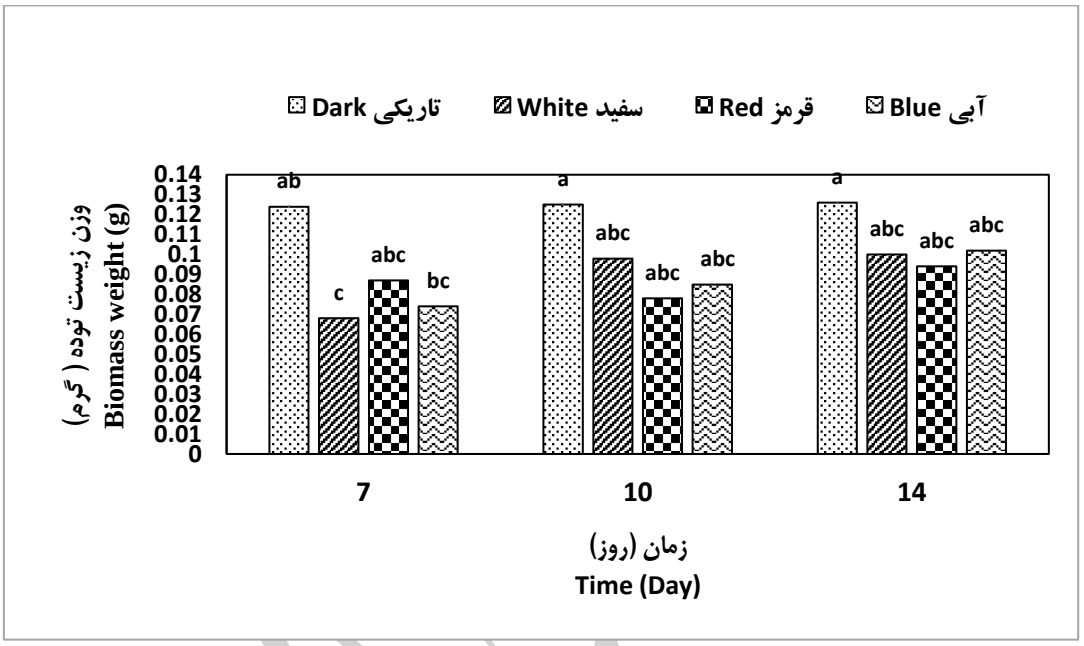
Figure 3. Plates containing *Monascus* on PDA medium, grown in different Spectra of light



نمودار ۲. میزان تولید توده زیستی موناسکوس پورپورئوس در طیف‌های مختلف نوری در محیط کشت جامد پس از ۱۴ روز

Figure 2. Biomass produced by *Monascus purpureus* in various spectra of light in solid state after 14 days

میزان زیست‌توده قارچی در محیط مایع: با توجه به داده‌های به‌دست‌آمده در نمودار (۳)، نور تأثیر معنی‌داری بر مقدار زیست‌توده داشت به‌طوری‌که بیشترین مقدار زیست‌توده قارچ موناسکوس از رشد در شرایط تاریکی (۰،۱۲۶ گرم در ۴۰ میلی‌لیتر محیط کشت) به دست آمد، اما زمان برداشت قارچ تفاوت معنی‌داری بر مقدار بیوماس ندارد، این نتایج نشان می‌دهد، برای رسیدن به حداکثر بیوماس قارچی، بهترین گزینه، رشد قارچ در شرایط تاریکی است.



نمودار ۳. وزن زیست‌توده قارچ موناسکوس پورپورئوس برحسب گرم در محیط مایع

Figure 3. Biomass weight (g) of *Monascus purpureus* in broth

مقایسه مقدار زیست توده در هردو محیط کشت جامد و مایع در روز چهاردهم: همانطور که گفته شد گرچه از لحاظ آماری تفاوتی بین مقدار زیست‌توده در محیط جامد تحت طیف‌های مختلف نوری وجود ندارد، اما از لحاظ مقداری مقدار زیست توده در شرایط تاریکی افزایش قابل توجهی نسبت به سایر شرایط نوری داشته است، کما اینکه این مسئله در مورد کشت مایع در روز چهاردهم نیز صدق میکند، اما در مورد حداقل مقدار زیست‌توده، در کشت جامد مربوط به نور آبی و در کشت مایع مربوط به نور قرمز می باشد، این تفاوت در مقدار بیوماس ممکن است به علت متفاوت بودن شرایط محیط کشت جامد و مایع مانند کشت مایع در ویال و کشت جامد در پتری‌دیش، ویا قرار گرفتن محیط مایع در شیکر باشد که در مورد کشت جامد این شرایط وجود ندارد (نمودار ۲و ۳).

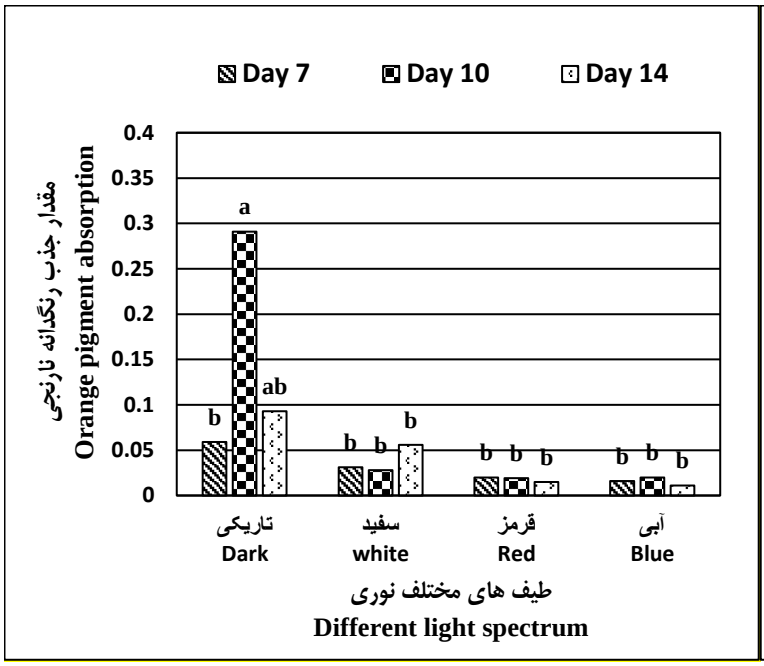
مقدار رنگ‌دانه‌ها در محیط کشت مایع:

رنگ‌دانه زرد: بین مقدار رنگ‌دانه زرد و نور در سطح ۵ درصد تفاوت معنی‌داری وجود دارد. بیشترین مقدار رنگ‌دانه زرد در شرایط تاریکی و روز دهم به دست آمد اما تفاوت معنی‌داری بین زمان‌های مختلف تیمار تاریکی و مقدار رنگ‌دانه وجود ندارد. قرار گرفتن قارچ در زیر نور آبی منجر به کاهش تولید رنگ‌دانه زرد شد، این مقدار در روز چهاردهم کمتر از روزهای هفتم و دهم بود (نمودار ۴- الف). همان‌طور که بابیتها و همکاران (۱) گزارش کردند، تابش نور مستقیم آبی به‌طورکلی تولید رنگ‌دانه را در موناسکوس پورپورئوس سرکوب می‌کند.

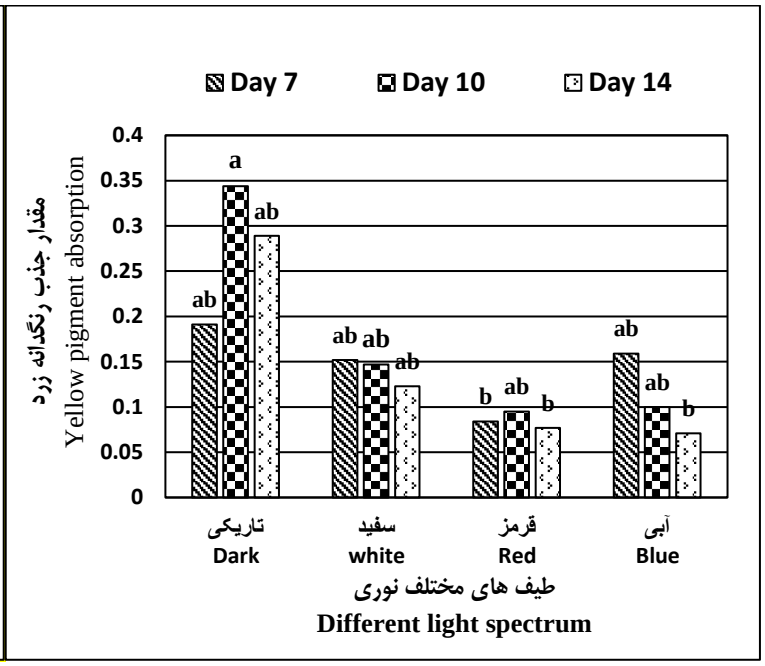
رنگ‌دانه نارنجی: با مشاهده نتایج مربوط به رنگ‌دانه نارنجی در جدول تجزیه واریانس شماره ۱ و نمودار ۴- ب می‌توان گفت که زمان برداشت تأثیر معنی‌داری بر مقدار رنگ‌دانه نارنجی ندارد، اما بین نور و مقدار رنگ‌دانه در سطح ۵ درصد رابطه معنی‌داری مشاهده شد. بالاترین مقدار رنگ‌دانه مربوط به رشد قارچ در شرایط تاریکی و روز دهم می‌باشد (نمودار ۴-ب) که تفاوت زیادی با سایر تیمارها و زمان‌ها داشت.

رنگ‌دانه قرمز: هم طیف‌های مختلف نوری و هم‌زمان برداشت بر روی مقدار رنگ‌دانه تأثیرگذار هستند، این تأثیر بین نور و رنگ‌دانه در سطح پنج درصد و بین زمان برداشت و رنگ‌دانه در سطح یک درصد است. بیشترین مقدار رنگ‌دانه قرمز در روز دهم کشت و در شرایط تاریکی تولیدشده است، اما بین سایر طیف‌های نوری و زمان برداشت اختلافی ازنظر تولید رنگ‌دانه قرمز دیده نشد (نمودار ۴-ج).

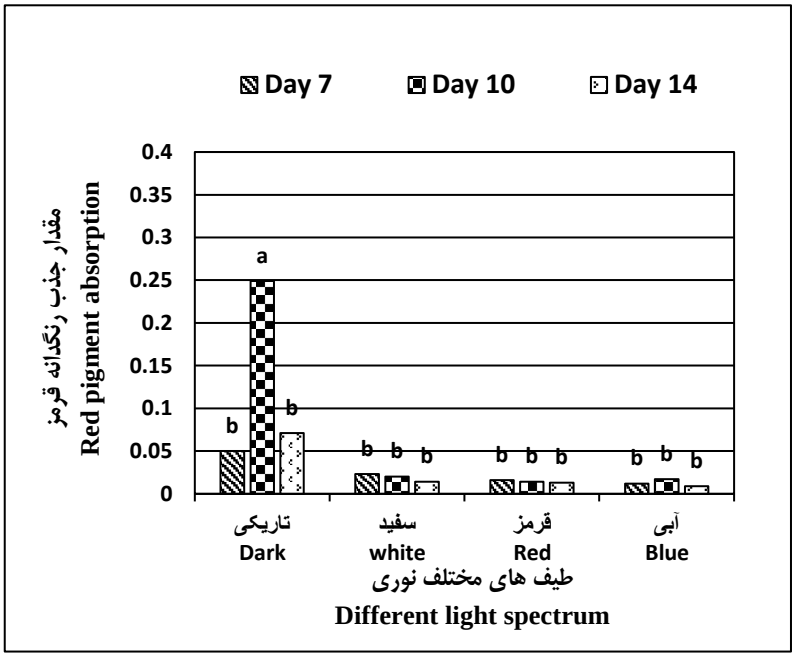
رنگ‌دانه کل: همان‌طور که در مورد رنگ‌دانه‌ها به‌صورت مجزا توضیح داده شد، این نتایج در مورد رنگ‌دانه کل هم صدق می‌کند. کشت قارچ در تاریکی منجر به افزایش مقدار رنگ‌دانه کل نسبت به سایر طیف‌های نوری شد و در سطح احتمال یک درصد معنی دار بود (جدول ۱). اختلاف زیادی بین مقدار رنگ‌دانه در روز دهم کشت در شرایط تاریکی با سایر شرایط نوری و روزهای برداشت وجود دارد (نمودار ۵)، گرچه با توجه به جدول تجزیه واریانس، این اختلاف معنی‌دار نیست.



(b) نمودار ب



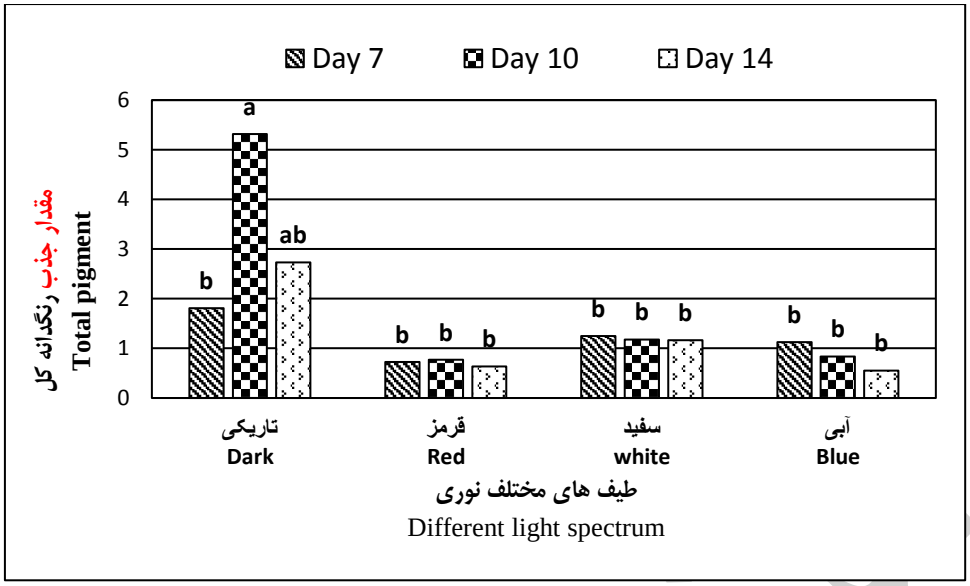
(a) نمودار الف



(c) نمودار ج

نمودار 4 . مقدار جذب رنگ‌دانه‌های زرد (الف) ، نارنجی (ب) و قرمز (ج) تولیدشده در قارچ موناسکوس پورپورئوس تحت تیمارهای مختلف نوری

Figure 4. The amount of absorbance of yellow, orange and red pigments of *Monascus purpureus* under different light treatments.



نمودار ۵. **مقدار جذب رنگ‌دانه تولیدشده در قارچ موناسکوس پورپورئوس تحت تیمارهای مختلف نوری**

Figure ۵.The amount of total pigment absorbance of *Monascus purpureus* under different light treatments

بحث و پیشنهادها

نتایج نشان داد که علاوه بر عواملی مانند منبع کربن، منبع نیتروژن، PH، درجه حرارت، مواد معدنی، فشار جزئی اکسیژن و دیگر میکروارگانیسم‌ها (۶) نور هم یک عامل مهم زیست‌محیطی برای توسعه و گسترش فرایندهای فیزیولوژیکی در قارچ موناسکوس پورپورئوس به شمار می‌رود. با توجه به این تحقیق، کشت این قارچ در شرایط تاریکی باعث افزایش رشد سلولی، مقدار بیوماس و رنگ‌دانه می‌شود، این نتایج نشان می‌دهد که عدم وجود نور باعث تحریک در رشد و تولید متابولیت‌های ثانویه در این قارچ است. اگرچه تفاوت معنی‌داری بین مقدار رنگ‌دانه و زمان برداشت، به‌جز برای رنگ‌دانه قرمز، مشاهده نشد، اما با توجه به اختلاف جزئی رنگ‌دانه‌ها در روز دهم کشت در شرایط تاریکی، می‌توان استنباط کرد که بهترین شرایط برای تولید بالاترین مقدار رنگ‌دانه، کشت قارچ موناسکوس در شرایط تاریکی و برداشت این قارچ در روز دهم کشت است. دلیل کاهش رنگدانه ها در روز ۱۴ را می‌توان این گونه استنباط کرد که اصولا میزان متابولیت های ثانویه در یک زمان مشخص حداکثر است و پس از آن ممکن است هم مصرف و هم تجزیه وجود داشته باشد. همچنین در بین رنگ‌دانه‌های تولیدشده توسط این قارچ، مقدار تولید رنگ‌دانه زرد در شرایط نوری مختلف، از سایر رنگ‌دانه‌ها بالاتر است. این نتایج با نتایج بابیتها و همکاران (۱) نیز هم‌خوانی دارد، آنها در مطالعات خود در مورد اثر نور نشان دادند که تاریکی مطلق در محیط رشدی این قارچ تاثیر زیادی در تحریک تولید رنگ‌دانه دارد. رشد کلنی در نور مستقیم منجر به عدم تولید رنگ‌دانه می شود. بنابراین، ادعای وجود گیرنده‌های نوری پاسخ‌دهنده به نور و تاریکی را مسلم فرض کردند.

البته محیط کشت هم تأثیر به سزایی در میزان این متابولیت‌ها دارد، به صورتی که چن و جونز (۴) بیان کردند که تخمیر جامد مقدار بیشتری رنگ‌دانه نسبت به تخمیر مایع دارد، این پدیده به علت حلالیت کم در محیط تخمیری و تجمع رنگ‌دانه داخل میسلیوم در کشت مایع ایجاد می‌شود. در مقابل، در بستر تخمیری جامد، موناسکوس در محیط بستر جامد نفوذ می‌کند و رنگ‌دانه‌ها در سطح منتشر می‌شوند، بستر جامد نه‌تنها مواد مغذی را صادر می‌کند، بلکه به‌عنوان لنگرگاه برای سلول عمل می‌کند، این ممکن است بهره‌وری تولید رنگ‌دانه را افزایش دهد؛ بنابراین پیشنهاد می‌شود که در مطالعات بعدی، برای رسیدن به حداکثر رنگ‌دانه، از محیط کشت جامد استفاده شود.

منابع

1. Babitha S., Carvahlo J.C., Soccol C.R., and Pandey A. 2008. Effect of light on growth, pigment production and culture morphology of *Monascus purpureus* in solid-state fermentation. World Journal of microbiology and Biotechnology, 24(11), pp.2671-2675.
2. Chang-lu, W.A.N.G., Xiao-wei, Z.H.A.N.G., Mian-hua, C.H.E.N., Qing-li, Z.H.O.U., Ying, W.A.N.G., Lu, H.A.O., Zhi-liang, F.U. and Zhao, B.A.N., 2009. Effect of Red Light on Cell Growth and Production of Secondary Metabolism in *Monascus M10*. Natural Product Research & Development, 21(1).
3. Chen, F.C., Manchard, P.S. and Whalley, W.B., 1969. The structure of monascin. Journal of the Chemical Society D: Chemical Communications, (3), pp.130-131.
4. Chen, M.H. and Johns, M.R., 1993. Effect of pH and nitrogen source on pigment production by *Monascus purpureus*. Applied Microbiology and Biotechnology, 40(1), pp.132-138.
5. Domínguez-Espinosa, R.M. and Webb, C., 2003. Submerged fermentation in wheat substrates for production of *Monascus* pigments. World Journal of microbiology and biotechnology, 19(3), pp.329-336.
6. Feng, Y., Shao, Y. and Chen, F., 2012. *Monascus* pigments. Applied microbiology and biotechnology, 96(6), pp.1421-1440 .
7. Houbraken, J. and Samson, R.A., 2011. Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of Trichocomaceae into three families. Studies in Mycology, 70, pp.1-51.
8. Japakaset, J., Wongkhalaung, C. and Leelawatcharamas, V., 2009. Utilization of soybean residue to produce monacolin K-cholesterol lowering agent. Songklanakarin Journal of Science & Technology, 31(1).
9. Jůzlová, P., Martinkova, L. and Křen, V., 1996. Secondary metabolites of the fungus *Monascus*: a review. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 16(3), pp.163-170.
10. Kumasaki, S., Nakanishi, K., Nishikawa, E. and Ohashi, M., 1962. Structure of monascorubrin. Tetrahedron, 18(10), pp.1171-1184.
11. Lin, T.F. and Demain, A.L., 1991. Effect of nutrition of *Monascus sp*. on formation of red pigments. Applied Microbiology and Biotechnology, 36(1), pp.70-75.

12. Lin, T.F., Yakushijin, K., Büchi, G.H. and Demain, A.L., 1992. Formation of water-soluble *Monascus* red pigments by biological and semi-synthetic processes. Journal of Industrial Microbiology, 9(3-4), pp.173-179.
13. Linden, H., 2002. A white collar protein senses blue light. Science, 297(5582), pp.777-778.
14. Liu, Y., 2003. Molecular mechanisms of entrainment in the *Neurospora* circadian clock. Journal of biological rhythms, 18(3), pp.195-205.
15. Manchand, P.S., Whalley, W.B. and Chen, F.C., 1973. Isolation and structure of ankaflavin: a new pigment from *Monascus anka*. Phytochemistry, 12(10), pp.2531-2532.
16. Mansoori, S., Yazdian, F., Azizi, M., Sheikhpour, M., Amoabediny, G., Hamedi, J. and Rasekh, B., 2015. Optimization of monacolin production in a controlled system. Applied Food Biotechnology, 2(4), pp.21-26.
17. Miyake, T., Mori, A., Kii, T., Okuno, T., Usui, Y., Sato, F., Sammoto, H., Watanabe, A. and Kariyama, M., 2005. Light effects on cell development and secondary metabolism in *Monascus*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 32(3), pp.103-108.
18. Patakova, P., Branska, B. and Patrovsky, M., 2016. *Monascus* Secondary Metabolites. Fungal Metabolites, pp.1-31.
19. Pattanagul, P., Pinthong, R., Phianmongkhol, A. and Leksawasdi, N., 2007. Review of angkak production (*Monascus purpureus*). Chiang Mai J Sci, 34(3), pp.319-328.
20. Röhrig, J., Kastner, C. and Fischer, R., 2013. Light inhibits spore germination through phytochrome in *Aspergillus nidulans*. Current genetics, 59(1-2), pp.55-62.
21. Salomon, H. and Karrer, P., 1932. Pflanzenfarbstoffe XXXVIII. Ein Farbstoff aus „rotem" Reis, Monascin. Helvetica Chimica Acta, 15(1), pp.18-22.
22. Shao, Y., Xu, L. and Chen, F., 2011. Genetic diversity analysis of Monascus strains using SRAP and ISSR markers. Mycoscience, 52(4), pp.224-233.
23. Sweeny, J.G., Estrada-Valdes, M.C., Iacobucci, G.A., Sato, H. and Sakamura, S., 1981. Photoprotection of the red pigments of *Monascus anka* in aqueous media by 1, 4, 6-trihydroxynaphthalene. Journal of agricultural and food chemistry, 29(6), pp.1189-1193.
24. Tisch, D. and Schmoll, M., 2010. Light regulation of metabolic pathways in fungi. Applied microbiology and biotechnology, 85(5), pp.1259-1277.
25. Vendruscolo, F., Schmidell, W., de Oliveira, D. and Ninow, J.L., 2017. Kinetic of orange pigment production from *Monascus ruber* on submerged fermentation. Bioprocess and biosystems engineering, 40(1), pp.115-121.
26. Yang, T., Guo, M., Yang, H., Guo, S. and Dong, C., 2016. The blue-light receptor CmWC-1 mediates fruit body development and secondary metabolism in *Cordyceps militaris*. Applied microbiology and biotechnology, 100(2), pp.743-755.
27. Yongsmith, B., Tabloka, W., Yongmanitchai, W. and Bavavoda, R., 1993. Culture conditions for yellow pigment formation by *Monascus sp*. KB 10 grown on cassava medium. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 9(1), pp.85-90.

The Effect of Different LED Light Wavelength on Mycelial Growth, Biomass and Secondary Metabolits in *Monascus purpureus*

Abstract

Introduction: the capacity to sense and respond to light is widespread in animals, plants, fungi and bacteria. In nature, light is one of most crucial environmental signals for developmental and physiological processes in various organisms, including filamentous fungi. The ability to sense light is crucial for many organisms determining timing and modality of development and orienting primary and secondary metabolic processes. Due to increase the number of sequenced fungal genomes, numerous genes which encoding protein that involved in light sensing and downstream gene regulation process have been identified. This expedited understanding the mechanisms by which the fungus activates physiological and morphological reactions in response to light. One of these fungi is the *Monascus purpureus*. The genus *Monascus* was classified in the family *Monascaceae*, but based on recent genome sequencing, it seems that this genus is more closely related to the genus Aspergillus, and thus should be reclassified in the Aspergillaceae family. The genus *Monuscus* is the most famous because of production of pigments and monacolins; however, it can also form other metabolites – citrinin, dimerumic acid, and GABA (γ-aminobutyric acid). Formation of particular metabolites depends on the strain and cultivation conditions. Monascus pigments (MPs) as natural food colorants have been widely utilized in food industries in the world, especially in China and Japan. Moreover, MPs possess a range of biological activities, such as anti-mutagenic and anticancer properties, antimicrobial activities, potential anti-obesity activities, and so on. So, in the past two decades, more and more attention has been paid to MPs. In this study, the effect of different LED light spectra on growth and secondary metabolites of *Monascus purpureus* is studied.

Materials and methods: In this study, in order to investigate the effect of light quality on growth rate, biomass and pigment production in *Monascus purpureus*, this fungus was cultivated under dark conditions and three light, white, red and blue LEDs and harvested in three times (seventh, tenth and fourteenth days) To measure the amount of pigment in the liquid medium. To measure the radial growth rate and biomass weight, a solid medium was used. Also, the absorbance of the samples was measured in 410, 470, and 510 nm wavelengths for yellow, orange and red pigments, respectively, using a spectrophotometric device.

Results: The results of this study shows that there is a significant correlation between pigment and optical spectra, so that the highest amount of Yellow, orange and red pigments was obtained in terms of darkness, which their amount are of 0.344, 0.291, 0.249, respectively. There was no significant difference between harvest time and pigment content except for red color at day 10 in dark conditions, with a value of 0.249. The smallest amount of pigment is also related to the red pigment produced on the 14th day in the blue light spectrum with an absorption of 0.009. Also, the highest radial growth rate was observed in the dark condition

with an average growth of 5.12 mm / day and the lowest radial growth was related to the cultivation of Monascus under the blue light spectrum with an average growth of 2.61 mm/day. However, there was no significant difference between biomass and light in solid media. The highest amount of biomass in the liquid medium was 0.126 g in 40 ml of culture medium with monascus culture in dark conditions on day 14 and the lowest amount of biomass was also obtained with 0.068 g in 40 ml of culture medium in white light on the seventh day.

Conclusion: The results showed that, in addition to factors such as carbon source, nitrogen source, pH, temperature, minerals, partial pressure of oxygen, and other microorganisms, light is also an important environmental factor for development and physiological processes in *Monascus purpureus*. According to this study, the cultivation of this fungus in the dark cussed an increases in cell growth, the amount of biomass and pigment. These results indicating that the lack of light stimulates the growth and production of secondary metabolites in this fungus. Although there was no significant difference between the amount of pigment and harvest time, except for the red pigment, but due to the slight difference in pigmentation on the 10th day of cultivation in dark conditions, it can be concluded that the best conditions for producing the highest amount of pigment are cultivation of *Monascus* in the darkness and harvest on the tenth day. Also, among pigments produced by this fungus, the amount of yellow pigment production under different light conditions was higher than other pigments. Chen, M. H. & Johns, M. R. (1993) showed that the solid-state yielded greater amount of pigment In comparison to to submerged fermentation. This phenomenon had been attributed to the pigment because of low solubility in the fermentation medium and pigment accumulation within the mycelium in submerged culture. In contrast, in solid-state fermentation, the *Monascus* sp penetrated into solid substrate and pigment released onto the surface. Solid state not only acting as a nutrient supplier, but also acting as anchorage for cells. Solid state environment is similar to environment of fungi which was normally excited. Based on the results, it is suggested in the following studies to compare the production of these pigments in a liquid and solid culture medium.

Keywords: Monascus purpureus, pigment, light, biomass, radial growth rate