نشریه پژوهش‌های صنایع غذایی/ جلد ۲۵ شماره۳/ سال ۱۳۹۴

بررسی رشد و تولید رنگ‌دانه توسط کپک *پنیسیلیوم آکولئاتوم* در آب پنیر

مجید افشاری*[۱]، فخری شهیدی[۲]، سید علی مرتضوی[۲]، فریده طباطبائی یزدی[۳] و زرین اسحاقی[۴]

تاریخ دریافت: ۹۳/٤/۱۸ تاریخ پذیرش: ۹۳/۹/۲۰

[۱] دانش آموخته دکتری میکروبیولوژی مواد غذایی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
[۲] استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
[۳] دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
[٤] دانشیار گروه شیمی، دانشگاه پیام نور مشهد
*مسئول مکاتبه: Email:majid349@yahoo.com

چکیده

کپک‌ها توانایی تولید رنگ‌دانه‌های مختلفی را با قابلیت مصرف به عنوان رنگ غذایی دارند. این پژوهش با هدف بررسی اثر عوامل موثر بر تولید رنگ‌دانه توسط کپک *پنیسیلیوم آکولئاتوم* انجام شد. در این پژوهش، ترکیب اثر pH (۵، ٦/۵ و۸)، دما (۲۵، ۳۰ و ۳۵°C) و سرعت همزدن (۱۰۰ و ۱۵۰ دور در دقیقه) بر رشد و تولید رنگ‌دانه توسط کپک *پنیسیلیوم آکولئاتوم* در آب پنیر به صورت غوطه‌ور مورد بررسی قرار گرفت. رنگ‌دانه تولید شده بعد از گذشت ۱۰ روز از زمان تلقیح با استفاده از صافی، سانتریفوژ و حلال اتیل استات جدا و خالص سازی شد. نتایج به صورت آزمون فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار انجام و میانگین داده‌ها توسط آزمون توکی در سطح ۵ درصد با استفاده از نرم افزار جامپ محاسبه و گزارش شد. حداکثر میزان رنگ‌دانه (۱/۳۸ گرم در لیتر) در pH=٦/۵، دمای ۳۰°C و سرعت همزدن ۱۵۰ دور در دقیقه بدست آمد. حداکثر میزان ماده خشک سلولی (۱۱/۱۲ گرم در لیتر) مربوط به pH=۸، دمای ۳۰°C و سرعت همزدن ۱۰۰ دور در دقیقه بدست آمد. نتایج نشان داد که ارتباط مستقیمی بین میزان رشد و میزان تولید رنگ‌دانه وجود ندارد. نتایج حاصل از آنالیز واریانس نشان داد که اثر pH و دما بر تولید رنگ‌دانه معنی‌دار است (P<۰/۰۵)، در صورتی که اثر سرعت همزدن بر تولید رنگ‌دانه معنی‌دار نبود (P≥۰/۰۵). pH اثر معنی‌دار بر رشد ندارد (P≥۰/۰۵)، در مقابل دما و سرعت همزدن اثر معنی‌داری بر رشد کپک دارند (P<۰/۰۵).

واژگان کلیدی: آب پنیر، *پنیسیلیوم آکولئاتوم*، رنگ‌دانه طبیعی، رشد سلولی

مقدمه

صنعت غذا، طی سالیان متمادی به منظور بهبود ویژگی-های مورد نظر مصرف‌کننده از انواع مختلف مواد افزودنی نظیر رنگ‌های مصنوعی، شیرین‌کننده‌های مصنوعی، طعم‌دهنده‌ها، مواد معطر، مواد سفیدکننده، مواد نگهدارنده و بافت‌دهنده در محصولات غذایی استفاده می‌کند، اما برخی از این مواد به شدت برای سلامتی انسان مضر است. اثرات برخی از این مواد ضعیف بوده و اختلالات و عوارض ناشی از آن‌ها با مصرف مستمر و طولانی مدت به تدریج بروز نموده و

سلامت افراد به ویژه گروه‌های آسیب‌پذیر جامعه (کودکان و نوجوانان) را با خطرات جدی روبه‌رو می-سازد. رنگ‌های مصنوعی که در نوشیدنی‌های گازدار، آب‌نبات‌ها، ژله‌ها و بسیاری از محصولات دیگر به طور گسترده مورد استفاده قرار می‌گیرند، جزو این دسته از افزودنی‌ها هستند که بیشتر به منظور جذب مشتری، پوشش دادن رنگ واقعی محصول و تشدید رنگ در مواد غذایی کاربرد دارند (آلایمو و همکاران ۲۰۰۱). اخیرا محدودیت‌های بسیاری از جانب سازمان‌های بین المللی و انستیتوهای تحقیقاتی مانند انستیتو ملی سرطان آمریکا در مورد استفاده از رنگ‌های مصنوعی خوراکی بیان شده است (نیچ نامتلا و همکاران ۲۰۰٦).

گیاهان، حیوانات و میکروب‌ها منابع رنگی زیستی می-باشند. از جنبه بیوتکنولوژیکی میکروب‌ها مناسب -ترین تولیدکنندگان رنگ از میان آن‌ها می‌باشند، زیرا تهیه، کشت، دستکاری ژنتیکی و ... آن‌ها آسان‌تر است. رنگ-های میکروبی محلول در آب با استفاده از آب یا الکل ضعیف استخراج و تغلیظ شده و حلال‌های آلی برای رنگدانه‌های چربی‌دوست استفاده می‌شوند. به علت تولید روز افزون غذاهای فرایند شده در جهان و تقاضای مصرف‌کنندگان برای افزودنی‌های غذایی طبیعی، تخمین‌زده می‌شود، بازار برای رنگ‌های طبیعی مورد استفاده در مواد غذایی در حال رشد باشد. بازارهای اصلی رنگ‌های زیستی غذایی در آمریکا، اروپا و ژاپن بوده و بازارهای جدیدی در چین، هند، کره جنوبی در حال شکل گرفتن هستند. این رنگ‌ها قبل از ارائه به بازار از نظر ایمنی مورد بررسی قرار می‌گیرند (آبرومند ۲۰۱۱). تولید بسیاری از رنگ‌های طبیعی با منشاء گیاهی دارای معایبی همچون آماده‌سازی مواد خام بوده که تحت تأثیر شرایط آب و هوایی قرار دارد. علاوه بر آن ممکن است شرایط شیمیایی در هر بار تولید، تغییر نماید و نیز رنگ‌های ناشی از این منابع به حرارت، نور و اکسیژن حساس بوده و بعضی از این رنگ‌ها همانندآنتوسیانین‌ها نیز تحت تأثیر pH قرار گرفته و تغییر می‌یابند. به طور متداول، اکثر رنگ‌های غذایی طبیعی که در اتحادیه اروپا و ایالات متحده آمریکا مجاز شمرده می‌شوند رنگ‌هایی هستند که حاصل از مواد خام گیاهی (گیاهان گلدار) می‌باشند (ماپاری و همکاران ۲۰۰۵).

قارچ‌ها به عنوان موجودات تجزیه کننده، نقش حیاتی در طبیعت ایفا می‌کنند. قارچ‌ها منابع ارزشمندی از رنگ-دانه‌های طبیعی هستند. تعداد رنگدانه‌های متنوع در قارچ‌ها بیش از ۱۰۰۰ عدد است. مهمترین ویژگی رنگ-دانه‌ها، تنوع زیاد آن‌ها است. قارچ‌ها دارای رنگ-دانه‌هایی هستند که در موجودات دیگر یافت نمی‌شوند یا به میزان بسیار ناچیز وجود دارند (استامر و فالکینهام ۱۹۸۹).

پنیسیلیوم یک جنس از قارچ‌های رشته‌ای بوده که اهمیت اصلی آن در محیط زیست، مواد غذایی و دارویی می‌باشد. پنیسیلیوم در سطح دنیا به عنوان یک تولید کننده متابولیت ثانویه و آنزیم خارج سلولی در سطح تجاری شناخته می‌شود. این توانایی قارچ‌شناسان را ترغیب نمود تا بر روی گونه‌های مشابه و یا حتی نژادهایی از یک گونه تحقیقاتی را انجام دهند (تیواری و همکاران ۲۰۱۱).

رنگدانه موناسکوس ویژگی‌های خوبی به عنوان رنگ غذایی دارد، به عنوان مثال پایداری شیمیایی و نوری مناسب و قدرت تولید رنگ بالایی دارد و محلولیت آن در آب در مجاورت با سایر ترکیبات مناسب است. اخیرا تولید رنگدانه‌های مشابه موناسکوس از نژادهای پنیسیلیوم که قابلیت کاربرد در صنایع غذایی را داشته-اند گزارش شده و دلیل این نوع کاربرد عدم تولید سیترینین و سایر سموم قارچی است. گروهی از کپک‌ها از جنس پنیسیلیوم مانند purpurogenum، aculeatum و funiculosum رنگدانه‌های مشابه کپک موناسکوس تولید می‌نماید (ماپاری و همکاران ۲۰۰۸ و۲۰۰۹b).

ثابت شده است که تفاوت‌های مورفولوژیکی و متابولیکی میان موناسکوس و پنیسیلیوم مرتبط با دما و pH، باعث تفاوت در خصوصیات رنگ‌دانه تولیدی می‌گردد. با این وجود نژادهای پنیسیلیوم رنگ‌دانه‌هایی را با ساختار شیمیایی مشابه با رنگ‌دانه‌های حاصل از موناسکوس تولید می‌نمایند. گونه‌های پنیسیلیوم به میزان بیشتری نسبت به گونه‌های موناسکوس رنگ‌دانه را به محیط ترشح، و استخراج عصاره رنگی آن‌ها راحت‌تر می‌باشد (ماپاری و همکاران ۲۰۰۸ و ۲۰۰۶) .

از مهمترین متغییرهای موثر بر فرایندهای بیو-تکنولوژیکی می‌توان به pH، دما و ترکیبات محیط کشت اشاره کرد که اثر زیادی بر تولید متابولیت‌هایی مانند رنگ‌دانه‌ها دارند، که کنترل آن‌ها در فرایندهای صنعتی زیستی دارای اهمیت زیادی است. اثر همزمان pH و دما در فعالیت پروتئین‌ها تغییر ایجاد کرده و به این دلیل شرایط کشت را می‌توان به وسیله بعضی فعالیت‌ها مانند رشد سلولی، تولید متابولیت‌های اولیه و ثانویه و فرایندهای تخمیر و اکسیداسیون سلولی کنترل کرد (مندز و همکاران ۲۰۱۱).

تولید رنگ‌دانه توسط گونه‌های کپک پنیسیلیوم، بازده تولید، نوع رنگ ایجاد شده، میزان حلالیت در آب و پایداری در برابر نور با تغییر ترکیبات محیط کشت تغییر می‌نماید به عنوان نمونه حضور اسیدهای آمینه در محیط کشت تولید رنگ‌دانه‌های قرمز محلول در آب را تحریک می‌نماید (ماپاری و همکاران ۲۰۱۰). رنگ-دانه‌های بدست آمده از گونه‌های پنیسیلیوم را می‌توان برای رنگ کردن مواد غذایی مانند محصولات نانوایی، نوشیدنی‌ها، غلات صبحانه‌ای، پنیر، ادویه‌ها، طعم‌ها، شیرینی‌ها، خامه، کیک، چربی‌ها و روغن‌ها، دسرهای یخ زده، ژلاتین، فراورده‌های لبنی، پودینگ‌ها، سس‌ها، فراورده‌های پروتئین گیاهی، شربت‌های میوه و انواع اسنک استفاده کرد. گونه‌های کپک پنیسیلیوم تولیدکننده رنگ‌های مشابه موناسکوس را می‌توان برای تولید رنگ، بهبود بافت و طعم در پنیرهای راکوفورت و استیلتون استفاده نمود. برخلاف گونه *P.roqueforti* که توانایی تولید سموم قارچی مانند آفلا توکسین، راکوفورتین و پاتولین را در طی مراحل رسیدن و نگهداری پنیر دارد، گونه‌های تولیدکننده رنگ مشابه موناسکوس غیر سمی و غیر بیماری‌زا هستند (ماپاری و همکاران ۲۰۰۹a).

در این تحقیق برای اولین بار اثر سه عامل اصلی دما، pH و سرعت همزدن بر رشد و تولید رنگ‌دانه توسط کپک *پنیسیلیوم آکولئاتوم* در محیط پساب صنعتی (آب پنیر) مورد مطالعه و بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

سویه میکروبی و شرایط کشت

کپک *Penicillium aculeatum* ATCC10409 از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران واقع در سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد. مواد شیمیایی و ترکیبات لازم برای تهیه محیط کشت از شرکت مرک تهیه شد. اسپورهای اولیه به محیط کشت مایع استریل شده (۱۲۱°C برای ۱۵ دقیقه) PDB منتقل و در دمای ۲۵°C در تاریکی گرمخانه‌گذاری شد، از کشت مادر، کشت‌های اولیه در محیط کشت استریل شده PDA به صورت شیب‌دار تهیه و در دمای ۲۵°C نگهداری شد. هر دو هفته یک بار عمل کشت مجدد تکرار شد. مشخصات میکروسکوپی و ماکروسکوپی کپک فوق بر اساس روش‌های متداول میکروبیولوژی مورد تایید قرار گرفت. آب پنیر اسیدی مورد استفاده از شرکت لبنیات ستاره شرق واقع در منطقه باخرز در استان خراسان رضوی تهیه شد.

میزان ۱۰۰ میلی‌لیتر از محیط کشت آب پنیر به ارلن-مایرهای ۵۰۰ میلی‌لیتری منتقل و pH آن توسط محلول‌های اسید کلریدریک ۱ نرمال و یا سود ۱ نرمال در۵، ۶/۵ و۸ تنظیم شد. محیط‌های کشت توسط اتوکلاو در دمای ۱۲۱°C به مدت ۱۵ دقیقه در فشار ۱ اتمسفر استریل شد. بعد از سرد شدن در دمای محیط، تحت

شرایط استریل ۴×۱۰^{۷} اسپور در میلی‌لیتر به هر ارلن-مایر تلقیح و در سه دمای ۲۵، ۳۰ و $۳۵^{\circ}C$ در اینکوباتور شیکردار با دو سرعت همزدن ۱۰۰ و ۱۵۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ روز در تاریکی، گرمخانه-گذاری شد (مندز و همکاران ۲۰۱۱).

آنالیز

pH نهایی هر نمونه توسط دستگاه pH متر[1] اندازه-گیری شد.

وزن سلولی کپک توسط صاف کردن محیط کشت، توسط کاغذ صافی (واتمن شماره۱[2]) و قراردادن در آون[3] در حرارت $۵۰^{\circ}C$ به مدت ۴۸ ساعت محاسبه شد (گاناسکاران و پورنیمال ۲۰۰۸).

ضریب رشد به صورت توده سلولی تولید شده به ازای منبع کربن (لاکتوز) مصرف شده محاسبه شد (پیساروا و همکاران ۲۰۰۵).

ضریب تولید رنگ‌دانه به صورت رنگ‌دانه تولید شده به ازای توده سلولی تولید شده در زمان یکسان محاسبه شد (مندز و همکاران ۲۰۱۱).

لاکتوز مصرف شده توسط روش لین آینون محاسبه شد (پروانه، ۱۳۷۳).

استخراج رنگ‌دانه

برای استخراج رنگ‌دانه تولید شده توسط کپک *پنیسیلیوم آکولئاتوم*، ابتدا محلول صاف شده مرحله قبل توسط دستگاه سانتریفوژ[4] با دور g ۳۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه برای حذف اسپورها و یا اجرام خارجی باقی‌مانده سانتریفوژ شد. سپس معادل حجم بدست آمده برای هر نمونه به آن اتیل استات افزوده و توسط محلول اسید کلریدریک ۲ نرمال، pH آن به ۳ رسید. دو فاز مایع به شدت توسط دست همزده شد و در نهایت به داخل یک قیف دکانتور ۲۵۰ میلی‌لیتری منتقل شد. بعد از گذشت ۱۰ دقیقه دو فاز از یکدیگر جدا شد. رنگ تولید شده در فاز اتیل استات قرار گرفت. جذب این فاز توسط دستگاه اسپکتروفتومتر[5] درطول موج ۴۲۰ نانومتر سنجیده شد. در مرحله بعد توسط دستگاه تغلیظ‌کننده چرخان تحت خلاء[6] حلال اتیل استات بازیابی و رنگ غلیظ شده استخراجی در آون با دمای $۴۰^{\circ}C$ به مدت ۴۸ ساعت خشک شد. وزن رنگ استخراجی هر نمونه توسط ترازوی دیجیتال با دقت g ۰/۰۰۰۱[7] پس از رسیدن به وزن ثابت محاسبه شد (سوپاندی و واردا ۲۰۱۲).

برنامه آماری

آزمایش‌ها بصورت آزمون فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار انجام شد. مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون توکی ($P<0.05$) صورت گرفت و تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار آماری جامپ[8] و رسم نمودارها با نرم افزار اکسل انجام شد.

نتایج و بحث

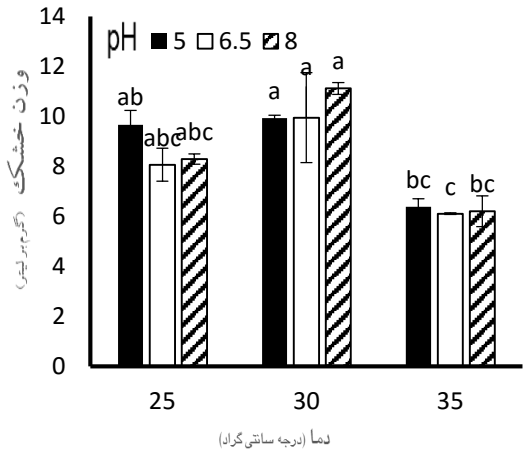
اثر pH، دما و سرعت همزدن بر رشد

پس از جداسازی فاز مایع از توده سلولی توسط کاغذ صافی، توده سلولی توسط گرمخانه‌گذاری در دمای $۵۰^{\circ}C$ خشک و توسط روش وزنی، وزن خشک اندازه-گیری شد (مندز و همکاران ۲۰۱۱). حداکثر رشد در pH=۸، دمای $۳۰^{\circ}C$ و سرعت همزدن برابر ۱۰۰ دور در دقیقه مشاهده شد (شکل ۱). همان‌طور که از شکل-های ۱ و۲ مشخص است دامنه تولید توده خشک سلولی بین ۲/۶۹ گرم در لیتر تا ۱۱/۱۲ گرم در لیتر متغییر است. با مقایسه میانگین‌ها در شکل ۲ مشاهده شد که رشد سلولی وابسته به دما بوده و pH اثری بر میزان توده سلولی ایجاد شده ندارد. در تیمار pH=۸، دمای $۳۰^{\circ}C$ و سرعت همزدن ۱۰۰ دور در دقیقه رشد سلولی بالا (۱۱/۱۲ گرم در لیتر) اما میزان تولید رنگ‌دانه پایین

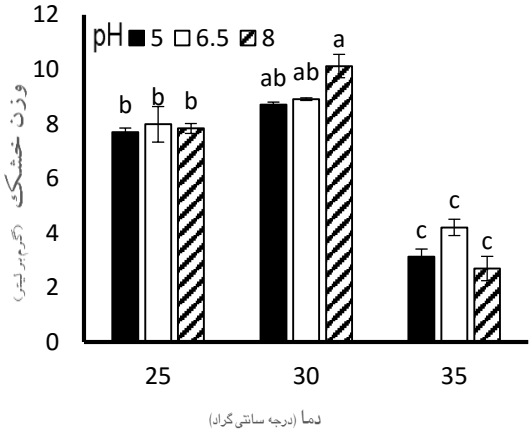
[1] pH/Ion-meter, Metrohm- Switzerland
[2] Whatman No.1
[3] Memert-Germany
[4] Sigma 3-30K-Germany
[5] WPA S2000UV/VIS- England
[6] Heydolph-Ireland
[7] AND-Japan
[8] SAS.JMP. Statistical Discovery, V8, O-NULL

بود (۰/۲۱ گرم در لیتر) که نشان داد تولید رنگ‌دانه در این میکروارگانیسم وابسته به رشد سلولی نیست (شکل۱ و شکل۳). مندز و همکاران (۲۰۱۱)، نتایج مشابهی را در ارتباط با عدم ارتباط رشد سلولی و تولید رنگ‌دانه در کپک *P.purpurgenum* GH2 گزارش دادند، این نتیجه توسط ماپاری و همکاران (۲۰۰۸)، در ارتباط با کپک *Epicoccum nigrum* نیز به اثبات رسیده است.

وازکوز دوهالت (۲۰۰۲) تولید توده سلولی را وابسته به یک متابولیسم اکسیداتیو دانست که باعث تولید مقدار زیادی ATP می‌گردد. مقدار لاکتوز مصرف شده به عنوان تنها منبع کربن موجود در محیط کشت در جداول ۱ و ۲ نشان داده شده است. ضریب ویژه رشد نمونه‌ها در محدوده بین ۰/۲٤ تا ۰/۷۲ است (جداول ۱ و ۲). ارتباط مستقیمی بین ضریب رشد و میزان تولید رنگ-دانه مشاهده نشد. به عنوان مثال در نمونه شماره ٥ با ضریب رشد برابر با ۰/۵۳، میزان تولید رنگ‌دانه ۱/۳۸ گرم در لیتر بود، در صورتی‌که در نمونه شماره ٤ با میزان مشابه ضریب رشد، میزان تولید رنگ‌دانه ۰/۲۸ گرم در لیتر بود (جدول۲، شکل٤). پیساروا و همکاران (۲۰۰۵)، نتایج مشابه را برای کپک موناسکوس گزارش دادند.



شکل ۱- اثر pH و دما بر رشد سلولی در سرعت همزدن ۱۰۰ دور در دقیقه



شکل ۲- اثر pH و دما بر رشد سلولی در سرعت همزدن ۱۵۰ دور در دقیقه

جدول ۱- اثر pH و دما بر فاکتورهای مورد آزمون در سرعت همزدن ۱۰۰ دور در دقیقه

نمونه	دما	pH	pH نهایی	جذب (۴۲۰ نانومتر)	ضریب تولید رنگ‌دانه(گرم در لیتر)	ضریب رشد	لاکتوز مصرف شده (گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر)
۱	۲۵	٥	۸/۰۵±۰/۰۱۲^{a}	۰/٤٤٦±۰/۰۱٥^{b}	۰/۰٤۲±۰/۰۰٦^{c}	۰/۷۲±۰/۰۳۸^{a}	۱/۳٤۱±۰/۰۱۸^{c}
۲	۳۰	٥	۸/۰۲±۰/۰۳۲^{a}	۰/۲٥٥±۰/۰۰٥^{c}	۰/۰۳±۰/۰۰٦^{b}	۰/٦۳±۰/۰۱۷^{ab}	۱/٥۷٦±۰/۰۲^{b}
۳	۳٥	٥	٥/۸٤±۰/۰٦۹^{c}	۰/٦۷٤±۰/۰۱^{a}	۰/۱۱۷±۰/۰۰٤^{a}	۰/٤۹±۰/۰۲۸^{bc}	۱/۳۰۳±۰/۰۰۷^{c}
٤	۲٥	٦/٥	۸/۰۱±۰/۰۷۸^{a}	۰/۲٤۱±۰/۰۸۳^{c}	۰/۰۳۸±۰/۰۰٦^{b}	۰/٥۱±۰/۰٥۲^{abc}	۱/٥۹±۰/۰۳۱^{b}
٥	۳۰	٦/٥	۷/۷۷±۰/۱۹٦^{a}	۰/۲۲۱±۰/۰۰۱^{c}	۰/۰۲۸±۰/۰۰٥^{c}	۰/٥٦±۰/۰۹۲^{abc}	۱/۷٦٦±۰/۰۳۱^{a}
٦	۳٥	٦/٥	٦/۳٥±۰/۲۸^{bc}	۰/٥٤٥±۰/۰۲٤^{ab}	۰/۱۱±۰/۰۰۰۱^{a}	۰/٤±۰/۰۰۳^{c}	۱/٥۱۲±۰/۰۰۳^{b}
۷	۲٥	۸	۸/۰۷±۰/۱۱۸^{a}	۰/۲۲۱±۰/۰۰۱^{c}	۰/۰۳٥±۰/۰۰۰٦^{c}	۰/٥٥±۰/۰۲٦^{abc}	۱/٥۰٦±۰/۰۳٦^{b}
۸	۳۰	۸	۸/۰۲±۰/۰۳٥^{a}	۰/۱۹۱±۰/۰۱۳^{c}	۰/۰۱۹±۰/۰۰٤^{c}	۰/٦۹±۰/۰۳۸^{ab}	۱/٦۲٤±۰/۰٥۹^{ab}
۹	۳٥	۸	٦/۷۲±۰/۱٦۹^{c}	۰/٤۷٥±۰/۰٤۱^{b}	۰/۰٦۷±۰/۰۰۸^{b}	۰/٥۱±۰/۰٤۳^{abc}	۱/۲۱٥±۰/۰۲٦^{c}

*اختلاف معنی‌دار در هر ستون توسط آزمون توکی در سطح ٥ درصد محاسبه شد.

**مقدار لاکتوز کل در آب پنیر مورد استفاده برابر با ۳/۲۳۸ گرم در ۱۰۰ میلی لیتر بود.

جدول ۲- اثر pH و دما بر فاکتورهای مورد آزمون در سرعت همزدن ۱۵۰ دور در دقیقه

نمونه	دما	pH	pH نهایی	جذب (۴۲۰ نانومتر)	ضریب تولید رنگدانه(گرم در لیتر)	ضریب رشد	لاکتوز مصرف شده (گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر)
۱	۲۵	۵	۸/۲۳±۰/۰۹۲^{ab}	۰/۰۵۹±۰/۰۰۵^{c}	۰/۰۱٤±۰/۰۰۱^{b}	۰/۵۱±۰/۰۱۲^{ab}	۱/۵۲۱±۰/۰۱۱^{ab}
۲	۳۰	۵	۸/۰۲±۰/۰٤۳^{ab}	۰/۸۱۱±۰/۰۵٤^{ab}	۰/۰۷۱±۰/۰۰٤^{b}	۰/۵۲±۰/۰۰۷^{ab}	۱/٦٦۸±۰/۰۱۱^{b}
۳	۳۵	۵	٦/۲±۰/۲۲^{d}	۰/۱۱۵±۰/۰۰۵^{bc}	۰/۰۵۸±۰/۰۰۸^{a}	۰/۲۷±۰/۰۳۵^{c}	۱/۱۷۹±۰/۰۵۵^{c}
٤	۲۵	٦/۵	۸/۲۳±۰/۱۹۱^{ab}	۰/۳۳۳±۰/۰۰۵^{bc}	۰/۰۳۵±۰/۰۰۱^{b}	۰/۵۳±۰/۰٤۳^{ab}	۱/۵۱۸±۰/۰۰۷^{ab}
۵	۳۰	٦/۵	۸/۱۵±۰/۰۱۷^{ab}	۱/٤۷۹±۰/۳۰۱^{a}	۰/۱۵۵±۰/۰۳۲^{a}	۰/۵۳±۰/۰۰۳^{ab}	۱/٦۹۲±۰/۰۲٦^{a}
٦	۳۵	٦/۵	۷/۷±۰/۱۰٤^{bc}	۰/۳۷٤±۰/۱۵۱^{bc}	۰/۰۵۷±۰/۰۲۱^{b}	۰/۳۸±۰/۰۲۳^{bc}	۱/۰۹۳±۰/۰۱۵^{c}
۷	۲۵	۸	۸/٤۲±۰/۰۱۵^{a}	۰/۰۵٤±۰/۰۰٤^{c}	۰/۰۱۳±۰/۰۰۱^{b}	۰/۵٦±۰/۰۲۹^{a}	۱/٤۱۲±۰/۰٤^{b}
۸	۳۰	۸	۸/۱۷±۰/۰٦۵^{ab}	۱/٤۵۱±۰/۲۸٦^{a}	۰/۰۸۲±۰/۰۱۷^{b}	۰/٦٤±۰/۰٦٤^{a}	۱/۵۹۷±۰/۰۹۷^{ab}
۹	۳۵	۸	۷/۲۳±۰/۰٦۹^{c}	۰/۰۹۳±۰/۰۰۳^{bc}	۰/۰۷۳±۰/۰۰۸^{b}	۰/۲٤±۰/۰۳۵^{c}	۱/۰۹۸±۰/۰۳۸^{c}

*اختلاف معنی‌دار در هر ستون توسط آزمون توکی در سطح ۵ درصد محاسبه شد.

**مقدار لاکتوز کل در آب پنیر مورد استفاده برابر با ۳/۲۳۸ گرم در ۱۰۰ میلی لیتر بود.

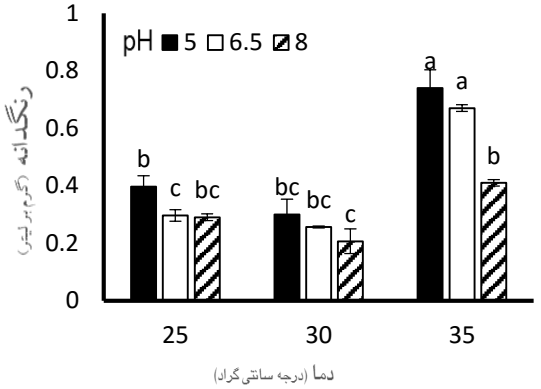
اثر pH، دما و سرعت همزدن بر تولید رنگدانه

پنیسیلیوم آکولئاتوم رنگدانه را تحت شرایط مختلف pH، دما و سرعت همزدن در آب پنیر تولید می‌نماید. تولید رنگدانه بعد از گذشت ۱۰ روز مورد ارزیابی قرار گرفت. بیشترین میزان رنگدانه مشاهده شده در تیمار pH=٦/۵، دمای ۳۰°C و سرعت همزدن ۱۵۰ دور در دقیقه بود. دامنه رنگدانه تولید شده بین ۰/۱ گرم در لیتر تا ۱/۳۸ گرم در لیتر است (شکل٤). بنا بر گزارش گانسکاران و پورنیمال (۲۰۰۸)، pH نقش کلیدی در تولید رنگدانه دارد. این محققین گزارش دادند که pH اثر زیادی بر تولید رنگدانه قرمز در کپک پنیسیلیوم دارد و بیشترین میزان تولید رنگدانه را در pH=۹ گزارش دادند. در دمای ۳۰°C در pHهای ٦/۵،۵ و۸ اختلاف معنی‌دار بین رنگدانه تولید شده وجود دارد (P<۰/۰۵) (شکل٤). مندز و همکاران (۲۰۱۱) بهترین pHرا برای تولید رنگدانه در کپک *پنیسیلیوم پورپورژنوم* ۵ گزارش دادند.

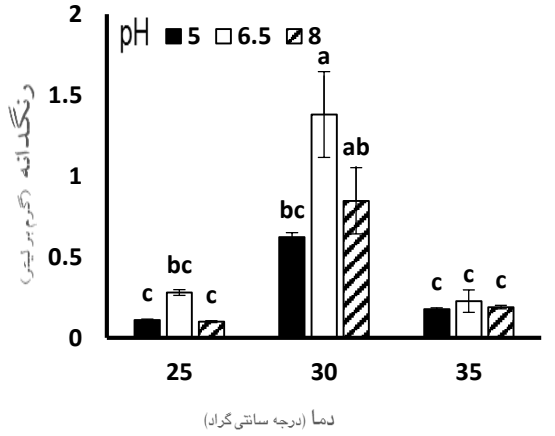
بهترین دما برای تولید رنگدانه ۳۰°C در سرعت همزدن برابر ۱۵۰ دور در دقیقه بود. نتایج مشابه توسط گانسکاران و همکاران (۲۰۰۸) برای کپک پنیسیلیوم و سرداریان و همکاران (۲۰۰٤) برای کپک *P.oxalicum* در تولید رنگدانه گزارش شده است. به عقیده مندز و همکاران (۲۰۱۱)، ترکیب اثر دما وpH اسیدی باعث تولید مناسب رنگدانه توسط کپک شده و ممکن است بر فرایندهای آنزیمی سلول قارچی اثر نماید. سو (۱۹۸۳) گزارش داد که، دمای ۲۸°C تا ۳۰°C بهترین دما برای تولید رنگدانه توسط کپک موناسکوس است. بابیتا و همکاران (۲۰۰۷) نیز بهترین دما برای تولید رنگدانه قرمز توسط کپک موناسکوس را۳۰°C گزارش دادند. ژو و همکاران (۲۰۰۹) بیان کردند که، ترکیب pH و دما دارای اثری مهم بر تنظیم مسیرهای متابولیک درون سلولی مانند تولید ATP دارد، که تنظیم و بهینه نمودن این شرایط باعث افزایش تولید رنگدانه می‌گردد.

کپک *پنیسیلیوم آکولئاتوم* تحت دماهای مختلف و دو سرعت همزدن برای تولید رنگدانه مورد ارزیابی قرار گرفت. از نتایج آنالیز واریانس می‌توان نتیجه گرفت که سرعت همزدن اثر معنی‌داری بر تولید رنگدانه نداشت (P≥۰/۰۵).

بهترین ضریب تولید رنگدانه در pH=٦/۵، دما ۳۰°C و سرعت همزدن ۱۵۰ دور در دقیقه و دامنه ضریب تولید رنگدانه بین ۰/۰۱۳ تا ۰/۱۵۵ گرم در لیتر بود (جدول۲).



شکل ۳- اثر pH و دما بر تولید رنگدانه در سرعت همزدن برابر ۱۰۰ دور در دقیقه



شکل ۴- اثر pH و دما بر تولید رنگدانه در سرعت همزدن برابر ۱۵۰ دور در دقیقه

نتیجه‌گیری

در سال‌های اخیر توجه زیادی به رنگدانه‌های میکروبی و مسیرهای بیوسنتز آن‌ها شده است. از لحاظ عملیات تخمیر میکروارگانیسم‌هایی همچون قارچ‌ها و باکتری‌ها می‌توانند یک منبع با ارزش برای تولید مواد رنگی بوده و می‌توانند به عنوان رنگ‌های اصلی با طیف گسترده به کار روند. تولید رنگ مصنوعی شاید از لحاظ اقتصادی مقرون به صرفه باشد، اما رنگ‌های مصنوعی با چالش‌هایی از جمله وابستگی به منابع نفتی غیر قابل احیاء، سمیت محیطی، مسائل بهداشتی و عدم بازیافت روبه رو هستند، در حالی که رنگ‌های طبیعی مصرف شده می‌توانند بازیافت شوند و هیچ بوی نامطبوعی ندارند، بنابراین جستجوی منابع قابل احیاء که از لحاظ زیست محیطی هم سازگار باشند برای تولید مواد رنگی یک نیاز ضروری است. موفقیت هر روش تولید رنگدانه حاصل از تخمیر بستگی به قابلیت پذیرش آن در بازار دارد، همچنین تایید مراکز ناظر و قانون‌گذار و سطح سرمایه‌گذاری مورد نیاز برای عرضه محصول به بازار و تصور و شناخت عموم مردم نسبت به فراورده‌های حاصل از بیوتکنولوژی را نیز باید مد نظر قرار داد.

در این تحقیق اثر شرایط مختلف دما، pH و سرعت همزدن بر تولید رنگدانه توسط کپک *پنیسیلیوم آکولئاتوم* بررسی و نشان داده شد که، تغییر در هر یک از عوامل ذکر شده اثری متفاوت در رشد سلولی و تولید رنگدانه دارد. مشخص شد دمای ۳۰°C، pH=۶/۵ و سرعت همزدن ۱۵۰ دور در دقیقه بیشترین میزان تولید رنگدانه را نشان می دهد. نتایج بدست آمده مربوط به ۳ تکرار مستقل بود، تا احتمال خطا در نتایج حذف گردد. در این تحقیق اثبات شد که کپک *پنیسیلیوم آکولئاتوم* توانایی مصرف قند لاکتوز آب پنیر را به عنوان تنها منبع کربن داشته و قادر به تولید رنگدانه می‌باشد. بنابراین آب پنیر می‌تواند به عنوان یک محیط کشت صنعتی برای تولید رنگدانه مورد استفاده قرار گیرد.

با توجه به موارد ذکر شده، امید است که با تولید رنگ‌های طبیعی و جایگزینی آن‌ها به جای رنگ‌های مصنوعی، وضعیت سلامتی و ایمنی جامعه را بهبود و با تولید این رنگ‌ها در داخل کشور با توجه به تعدد واحدهای مصرف کننده رنگ‌های افزودنی گام موثری در قطع وابستگی به واردات این رنگ‌ها برداشت.

منابع مورداستفاده

پروانه و، ۱۳۷۷، کنترل کیفی و آزمایش‌های شیمیایی مواد غذایی، چاپ چهارم، موسسه چاپ و انتشارات دانشگاه تهران، صفحات ۵۵-۵۸.

Alaimo K, Olson CM and Frongillo EA, 2001. Food insufficiency and American school-aged children's cognitive, academic, and psychosocial development. Pediatrics 10: 44-56.

Aberoumand A, 2011. A review article on edible pigments properties and sources as natural biocolorant in food stuff and food industry. World Journal of Dairy and Food Sciences 6:71-78.

Babitha S, Soccol CR and Pandey A, 2007. Solid-state fermentation for the production of *Monscus* pigments from jack fruit seed. Bioresearch Technology 98: 1554-1560.

Gunaskaran S and Poornimal R, 2008. Optimization of fermentation conditions for red pigment production from *Penicillium* sp. under submerged cultivation. African Journal of Biotechnology 7 (12): 1894-1898.

Mapari S, Nielsen KF, Olarsen TC, Frisvad J, Meyar AS and Thrane U, 2005.Exploring fungal biodiversity for the production of water-soluble pigments as potential natural food colorants. Food Biotechnology 16: 231-238.

Mapari SA, Meyer AS and Thrane V, 2006. Colorimetric characterization for comparative analysis of fungal pigments and natural food colorants. Journal of Agriculture Food Chemistry 54:7027-7035.

Mapari SA, Hansen ME, Meyer AS and Thrane U, 2008. Computerized screening for novel producers of monascus- like food pigments in *Penicillium* species. Journal of Agricultural and Food Chemistry 56: 9981-9989.

Mapari SA, 2009a. Chemotaxonomic exploration of fungal biodiversity for polyketide natural food colorants. PhD -Thesis. Central for Microbial Biotechnology Department of System Biology, Technical University of Denmark, Kgs. Lyngby.

Mapari SA, Meyer AS, Thrane U and Frisvad JC, 2009b. Identification of potentially safe promising fungal cell factories for the production of polyketide natural food colorants using chemataxonomix rationale. Microbial Cell Factories 8:24.

Mapari SA, Thrane U and Meyer AS, 2010. Fungal polyketide azaphilon pigments as future natural food colorants. (Review).Trends in Biotechnology 28:300-307.

Mendez A, perez C, Montanez JS, Martinez G and Aguilar CN ,2011.Red pigment production by *Penicillium purpurogenum* GH_2 is influenced by pH and temperature. Journal of Zhejiang University – Science B (Biomedicine & Biotechnology) 12(12):961-968.

Nichenametla SN, Taruscio TG, Barney DL and Exon JH, 2006. A review of the effects and mechanisms of polyphenolics in cancer. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 46: 161-183.

Pisareva E, Savove V and Kujumdzieva A, 2005. Pigment and citrinin biosynthesis by fungi belonging to genus *Monascus*. Zeitschrift fur Naturforsch 60: 116-120.

Stomer RS and falkinham JO, 1989. Differences in antimicrobial susceptibility of pigmented and unpigmented colonial variants of *Mycobacterium avium*. Journal Clinical Microbiology 27: 2459-2465.

Sopandi T and Wardah, 2012. Sub-acute toxicity of pigment derived from *Penicillium resticulosum* in mice. Journal of Microbiology Indonesia 6(1):35-41.

Sardaryan E, Zihlova H, Strand R and Cermokova Z, 2004.Arpink red meet a new nature red food colorant of microbial origin. In: Pigments in food, More than Colours....., I...Dufosse (ED.) Universite' de Bretagne Occidental Publ., Quimper, France 207-208.

Tiwari KL, Jadhav SK and Kumar A, 2011. Morphological and molecular study of different *penicillium* species. Middle-East Journal of Scientific Research 7 (2): 203-210

Su YC, 1983. Fermentative production of anka-pigments (*Monascus* pigments). Journal of Microbiology and Bioengineering 11: 325-329.

Vázquez-Duhalt R, 2002.Temodinámica Biológica. AGT Editor, S. A., México DF: AGT Editor SA 2002:223.

Zhou J, Liming L, Zhongping S, Goucheng D and Chen J, 2009. ATP in current biotechnology: Regulation, applications and perspectives. Biotechnology Advances 27: 94-101.

Investigating of growth and pigment production by *Penicillium aculeatum* in whey

M Afshari[1*], F Shahidi[2], SA Mortazavi[2], F Tabatabaei Yazdi[3] and Z Eshaghi[4]

Received: July 09, 2014 Accepted: December 11, 2014

[1]PhD Graduate of food Microbiology, Department of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
[2]Professor, Department of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
[3]Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
[4]Associate Professor, Department of chemistry, Payame Noor University of Mashhad, Mashhad, Iran
[*]Corresponding author: E mail: majid349@yahoo.com

Abstract

Molds have the ability to produce different pigments with consumption as food color. This study aimed to investigate the effect of the factors affecting the production of pigment by the *Penicillium aculeatum.* In this study, the combined effect of pH (5, 6.5 and 8), temperatures (25, 30 and35) and agitation speed levels (100 and 150 rpm) on pigment production and mycelial growth of *Penicillium aculeatum* was investigated in submerged whey media. After ten days of incubation, the produced pigment was isolated and purified using filtration, centrifugation and ethyl acetate solvent. All experiments were conducted in a completely randomized factorial design with three replications. The data were compared using the mean Tukey's test and data analysis was performed using the statistical software JUMP V 8.0.1. The best production of pigment (1.38 g/L) was obtained with pH value of 6.5, temperature of 30 ˚C and agitation speed of 150 rpm. In contrast, the maximal biomass concentration (11.12 g/L) was obtained at pH value of 8, temperature of 30˚C and agitation speed of 100rpm. These results demonstrated that biomass and pigment production were not directly associated. This study showed that the effect of pH and temperature on pigment production are significant ($p<0.05$) but agitation speed not significant ($p\geq0.05$). pH has no significant effect of growth ($p\geq0.05$), In contrast, temperature and agitation speed have a significant effect on the growth($p<0.05$).

Keywords: Whey, *Penicillium aculeatum*, Natural pigment, Cellular growth