

نوع مقاله: پژوهشی

بهینه‌یابی ترکیبات محیط کشت *Monascus* با استفاده از ضایعات کشاورزی-صنعتی به منظور تولید حداکثری رنگدانه‌های آزافیلون با حداقل میزان سیتترین

مرجان نوری* 

*دانشیار، گروه مهندسی علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد رودهن، تهران، ایران.

تاریخ ارسال: ۱۴۰۵/۰۶/۰۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۶/۳۱

چکیده

رنگدانه‌های طبیعی آزافیلونی گونه‌های *Monascus* به دلیل ویژگی‌های زیستی و قابلیت رنگ‌دهی، جایگزینی ایده‌آل برای رنگ‌های سنتزی در صنایع غذایی، دارویی و آرایشی هستند. این پژوهش با هدف تولید رنگدانه‌های آزافیلونی *Monascus purpureus* با استفاده از ضایعات کشاورزی-صنعتی، کاهش سیتترین و ارزیابی ویژگی‌های زیستی رنگدانه به انجام رسید. تولید رنگدانه در تخمیر غوطه‌ور (SmF) و حالت جامد (SSF) با بهره‌گیری از سبوس برنج، پودر ذرت، کنجاله سویا و ملاس به عنوان منابع اصلی کربن و نیتروژن بررسی گردید. دما، pH و هوادهی برای دستیابی به حداکثر بازدهی رنگی و خالص‌سازی اولیه عصاره‌ها ارزیابی شد. تولید رنگدانه در SmF بین ۳۸/۵ تا ۷۶/۱۵ واحد جذب بر میلی‌لیتر و در SSF بین ۱۸۵ تا ۳۳۰ واحد جذب بر گرم متغیر بود. زیست‌توده در SmF برابر ۶/۱ تا ۱۲/۱ g/L و در SSF برابر ۱۴/۶ تا ۳۱/۸ گرم بر ۱۰۰ گرم اندازه‌گیری شد. سیتترین در SmF و SSF به ترتیب در محدوده ۱۰/۲ تا ۲۴/۵ میلی‌گرم بر لیتر و ۶/۱ تا ۱۳/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم و نسبت رنگدانه به سیتترین در SSF به طور معنی‌داری بیشتر بود تا در SmF. تیمار S6 شامل سبوس برنج، پودر ذرت، کنجاله سویا و ملاس (به ترتیب ۵۰، ۳۰، ۱۵ و ۵ درصد) به عنوان تیمار بهینه انتخاب شد. رنگدانه خالص شده فعالیت ضد میکروبی مطلوبی علیه *Staphylococcus aureus*، آنتی‌اکسیدانی قابل توجه ($IC_{50}=0.42$ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و اثر ضد تکثیر بر Caco-2 ($IC_{50}=145.51$ میکروگرم بر میلی‌لیتر) نشان داد. یافته‌ها نشان دادند تخمیر حالت جامد از ضایعات کشاورزی-صنعتی، روشی کارآمد برای تولید رنگدانه‌های طبیعی *Monascus* است که ظرفیت بالایی برای تجاری‌سازی در صنایع غذایی، داروسازی و زیست‌فناوری دارد.

واژه‌های کلیدی: تخمیر بستر جامد، سیتترین، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، فعالیت ضد میکروبی

مقدمه

رنگدانه‌های آزافیلونی با طیف رنگی زرد، نارنجی و قرمز و افزایش نگرانی مصرف‌کنندگان نسبت به مخاطرات احتمالی رنگ‌های سنتزی و گرایش به استفاده از رنگ‌های طبیعی، موجب افزایش توجه به رنگدانه‌های میکروبی به عنوان جایگزین‌های پایدار در صنایع غذایی شده است (Chen, et al. 2025; Hosseini and Karamali, 2026). در این میان، *Monascus purpureus* به دلیل تولید همچنین برخوردار از خواص زیستی مانند فعالیت آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروبی و ضد التهابی یکی از مهم‌ترین منابع تولید رنگ‌های طبیعی محسوب می‌شود (De Almeida, et al. 2021). با وجود این مزایا، تولید صنعتی رنگدانه‌های *Monascus* با چالش تولید همزمان سیتترین همراه است که یک مایکوتوکسین نفروتوکسیک است و ایمنی

رنگدانه، زیست‌توده و سیتترینین مواردی مانند نسبت رنگدانه به سیتترینین به‌عنوان شاخص همزمان بازده و ایمنی و نیز ویژگی‌های زیستی رنگدانه تیمار برتر نیز ارزیابی شد. نوآوری پژوهش مقایسه همزمان اثر نوع بستر و سامانه تخمیر بر تولید، ایمنی و کیفیت عملکردی رنگدانه‌های *Monascus* است.

مواد و روش‌ها

مواد اولیه، محیط‌های کشت و شرایط تخمیر

در این پژوهش به‌منظور توسعه یک فرآیند زیستی پایدار و کاهش هزینه تولید، از ضایعات کشاورزی- صنعتی شامل سبوس برنج، ضایعات ذرت، ملاس چغندر و کنجاله سویا به‌عنوان منابع کربن و نیتروژن استفاده شد. قارچ *M. purpureus* PTCC5303 از مرکز ذخایر زیستی و ژنتیکی ایران تهیه گردید. بر اساس ترکیب مواد اولیه، ۲۰ تیمار شامل ۱۰ تیمار برای تخمیر غوطه‌ور (SmF) (جدول ۱) و ۱۰ تیمار برای تخمیر حالت جامد (SSF) (جدول ۲) طراحی شد. ترکیب تیمارها به‌عنوان یک طرح غربالگری اولیه مبتنی بر مطالعات پیشین طراحی گردید. در محیط‌های SmF ملاس، عصاره سبوس برنج و شربت ذرت به‌عنوان منابع کربن و کنجاله سویای هیدرولیز شده به‌عنوان منبع نیتروژن و KH_2PO_4 و $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ به‌عنوان نمک‌های معدنی به کار رفتند. در تیمارهای SSF نیز سبوس برنج، پودر ذرت، ملاس، کنجاله سویا و نمک‌های معدنی با مقادیر مشخص مخلوط شدند؛ به‌طوری‌که مجموع اجزای هر محیط در SmF معادل ۱۰۰ میلی‌لیتر و در SSF برابر با ۱۰۰ گرم ماده خشک بود. برای تهیه تلقیح، قارچ به مدت ۵ روز روی محیط PDA در دمای ۳۰ درجه سلسیوس کشت داده شد. اسپورها با آب مقطر استریل حاوی ۰/۱ درصد توتین ۸۰ برداشت و غلظت سوسپانسیون به 10^7 اسپور در میلی‌لیتر تنظیم شد. میزان تلقیح در تمامی آزمایش‌ها ۱۰ درصد (وزنی بر وزنی یا حجمی بر حجمی) در نظر گرفته شد. تخمیر غوطه‌ور در ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت، پس از استریل‌سازی در ۱۲۱ درجه

محصول نهایی را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Srianta, et al. 2016). عوامل مختلفی از جمله ترکیب محیط کشت، منابع کربن و نیتروژن و شرایط تخمیر بر تولید همزمان رنگدانه و سیتترینین اثرگذار هستند. با این حال، بسیاری از مطالعات تنها بر افزایش تولید رنگدانه تمرکز داشته‌اند و به‌ارزیابی همزمان ایمنی محصول کمتر توجه شده است (Gong, et al. 2023; Tabrizi and Zomorodi, 2026). از سوی دیگر، هزینه بالای محیط‌های کشت متداول موجب شده است استفاده از ضایعات کشاورزی- صنعتی مانند سبوس برنج، ملاس، ضایعات ذرت و کنجاله سویا به‌عنوان منابع جایگزین کربن و نیتروژن مورد توجه قرار گیرد. این مواد علاوه بر کاهش هزینه تولید، در راستای توسعه اقتصاد چرخشی نیز قابل استفاده هستند (De Almeida, et al. 2021; Huang, et al. 2023). رنگدانه‌های *Monascus* عمدتاً در دو سامانه تخمیر غوطه‌ور (SmF) و حالت جامد (SSF) تولید می‌شوند که به دلیل تفاوت در شرایط رشد، عملکرد متفاوتی در تولید متابولیت‌های ثانویه دارند (Chen, et al. 2025). اگرچه مطالعات متعددی اثر نوع بستر یا شرایط تخمیر را در هر یک از این سامانه‌ها بررسی کرده‌اند (Chen, et al. 2025; Huang, et al. 2023)، اما مطالعات برای مقایسه مستقیم این دو سامانه بر پایه ضایعات کشاورزی- صنعتی از نظر تولید رنگدانه، تشکیل سیتترینین و کیفیت محصول هنوز محدود است. علاوه بر این، در اغلب پژوهش‌ها تنها میزان تولید رنگدانه گزارش شده و شاخص‌هایی مانند نسبت رنگدانه به سیتترینین و ارتباط آن با ویژگی‌های زیستی محصول کمتر بررسی شده است (Gong, et al. 2023; Hsu, et al. 2011). هدف این پژوهش بررسی تولید رنگدانه‌های آزافیلونی توسط *M. purpureus* با استفاده از سبوس برنج، ملاس، ضایعات ذرت و کنجاله سویا در دو سامانه تخمیر غوطه‌ور (SmF) و حالت جامد (SSF) است. علاوه بر تولید

سلسیوس به مدت ۲۰ دقیقه، در ۳۲ درجه سلسیوس، با استریل‌سازی و تلقیح، نمونه‌ها به مدت ۱۰ روز در ۳۲ درجه سرعت ۱۸۰ دور در دقیقه و به مدت ۱۰ روز تنظیم شد. در سلسیوس انکوبه شدند. تمامی آزمایش‌ها در شرایط استریل و با تخمیر حالت جامد، رطوبت اولیه بسترها با آب یا محلول کنترل یکسان پارامترهای عملیاتی اجرا شدند (Keivani and Jahadi, 2022). معدنی استریل به ۵۰ تا ۶۸ درصد تنظیم شد و پس از

جدول ۱. ترکیب و درصد اجزای محیط‌های کشت مورد استفاده (درصد، حجمی/حجمی) در تیمارهای مختلف تخمیر غوطه‌ور (SmF) برای

تولید رنگدانه‌های آزافیلونی توسط *Monascus purpureus*

Table 1. Composition and percentage of culture medium components (% v/v) used in different submerged fermentation (SmF) treatments for azaphilone pigment production by *Monascus purpureus*

Treatment تیمار	Molasses ملاس	Rice bran extract عصاره سبوس برنج	Corn syrup پودر ذرت	Hydrolyzed soybean meal کنجاله سویای هیدرولیز شده	KH ₂ PO ₄	MgSO ₄ .7H ₂ O	Total کل
L1	48	25	15	8	2	2	100
L2	52	20	10	12	3	3	100
L3	40	30	15	10	3	2	100
L4	55	15	10	15	3	2	100
L5	45	28	15	8	2	2	100
L6	60	10	8	15	4	3	100
L7	42	35	10	8	3	2	100
L8	50	22	15	8	3	2	100
L9	47	25	12	10	3	3	100
L10	58	18	12	7	3	2	100

توجه: مقادیر نشان‌دهنده درصد ترکیب هر یک از اجزای موجود در محیط تخمیر غوطه‌وری نهایی (v/v) هستند. KH₂PO₄: دی‌هیدروژن فسفات پتاسیم؛ MgSO₄.7H₂O: سولفات منیزیم هپتاهیدرات (هفت‌آبه)

Note: Values represent the percentage composition of each component in the final submerged fermentation medium (v/v). KH₂PO₄: potassium dihydrogen phosphate; MgSO₄.7H₂O: magnesium sulfate heptahydrate

شاخص‌های عملکرد محیط کشت هدف

اندازه‌گیری میزان تولید رنگدانه

شد. پس از استخراج رنگدانه، جذب نمونه‌ها در ۵۰۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری و مقدار حاصل به‌عنوان شاخص تولید رنگدانه قرمز استفاده شد. لازم است گفته شود طول موج‌های ۴۱۰ و ۴۷۰ نانومتر به‌ترتیب می‌توانند برای ارزیابی رنگدانه‌های زرد و نارنجی *Monascus* به‌کار روند، اما مقادیر بازده رنگدانه گزارش‌شده در این مطالعه بر اساس A₅₀₀ محاسبه شده‌اند. نتایج به‌صورت واحد جذب بر میلی‌لیتر برای SmF و واحد جذب بر گرم بستر خشک برای SSF گزارش شدند (Mou, et al. 2023).

پس از پایان تخمیر، رنگدانه‌ها با استفاده از اتانول ۷۰ درصد استخراج شدند. جذب نوری عصاره‌ها با اسپکتروفتومتر (Shimadzu, Japan) در طول‌موج‌های ۴۱۰، ۴۷۰ و ۵۰۰ نانومتر به‌ترتیب برای رنگدانه‌های زرد، نارنجی و قرمز اندازه‌گیری شد. بازده رنگدانه قرمز *Monascus* بر اساس میزان جذب عصاره رنگدانه در طول موج ۵۰۰ نانومتر (A₅₀₀) تعیین

جدول ۲. ترکیب و اجزای بسترهای مورد استفاده (گرم) در تیمارهای مختلف تخمیر حالت جامد (SSF) برای تولید رنگدانه‌های آزاфіلونی توسط *Monascus purpureus*

Table 2. Composition of substrate formulations (g) used in different solid-state fermentation (SSF) treatments for the production of azaphilone pigments by *Monascus purpureus*

Treatment تیمار	Rice bran سبوس برنج	Corn powder پودر ذرت	Soybean meal کنجاله سویا	Molasses ملاس	Potassium dihydrogen phosphate (KH ₂ PO ₄) دی‌هیدروژن فسفات پتاسیم	Magnesium sulfate heptahydrate (MgSO ₄ .7H ₂ O) سولفات منیزیم هپتاهیدرات (هفت‌آبه)
S1	60	20	10	8	1.5	0.5
S2	55	25	12	6	1.5	0.5
S3	65	15	8	10	1.2	0.5
S4	50	30	10	8	1.3	0.7
S5	70	10	8	9	1.0	0.5
S6	45	35	12	6	1.5	0.5
S7	68	12	10	7	1.3	0.7
S8	52	28	14	4	1.6	0.4
S9	58	22	10	8	1.4	0.6
S10	62	18	9	9	1.2	0.5

Values are expressed as grams (g) per 100 g dry substrate mixture

مقادیر بر حسب گرم (g) در هر ۱۰۰ گرم از مخلوط سوبسترای خشک بیان شده‌اند

روش HPLC-FLD تحت شرایط ذکر شده گزارش شدند (De

تعیین میزان غلظت سیتیرنین

Almeida, et al. 2021). مقدار سیتیرنین تولیدشده توسط *M. purpureus* با

استفاده از دستگاه HPLC (Agilent 1260 Infinity II, USA)

در تخمیر مایع، زیست‌توده پس از سانتریفیوژ شدن، شست‌وشو شدن و خشک کردن در ۱۰۵ درجه سلسیوس تا وزن ثابت اندازه‌گیری و به‌صورت گرم در لیتر گزارش شد. در تخمیر حالت جامد (SSF)، تغییرات جرم خشک بستر با اندازه‌گیری وزن خشک بستر پیش از شروع تخمیر و پس از پایان دوره تخمیر تعیین شد. مقدار حاصل به‌صورت گرم تغییر در جرم خشک به ازای ۱۰۰ گرم بستر اولیه گزارش گردید. در این روش، تصحیح مستقلى برای کاهش جرم ناشی از مصرف سوبسترا، تولید CO₂ و آب یا دیگر اتلاف‌های جرمی اعمال نشد؛ از این‌رو، مقدار به‌دست‌آمده معادل وزن خالص زیست‌توده میسلیمی نیست و به‌عنوان یک برآورد غیرمستقیم از تغییرات جرم خشک بستر در ارتباط با رشد قارچ در نظر گرفته شد (Yudiarti, et al. 2019).

مجهز به آشکارساز فلورسانس (FLD) تعیین شد. پس از استخراج نمونه با حلال و فیلتراسیون از طریق فیلتر غشایی با قطر منافذ ۰/۴۵ میکرومتر، نمونه‌ها بدون طی شدن مرحله اضافی پاک‌سازی با ستون SPE یا Immunoaffinity Column به حجم ۲۰ میکرولیتر به ستون فاز معکوس C18 (۲۵۰ × ۴/۶ میلی‌متر، اندازه ذرات ۵ میکرومتر) تزریق شدند. فاز متحرک شامل استونیتریل و آب با نسبت ۶۵:۳۵ (v/v) و سرعت جریان ۱ میلی‌لیتر در دقیقه بود. سیتیرنین با طول موج تحریک ۳۳۱ نانومتر و طول موج نشر ۵۰۰ نانومتر آشکارسازی شد. بر اساس منحنی استاندارد تهیه‌شده از استاندارد خالص سیتیرنین کمی‌سازی صورت گرفت (De Almeida et al., 2021). در این مطالعه، پارامترهای اعتبارسنجی شامل درصد بازیابی (Recovery) و حد تشخیص (LOD) به‌طور تجربی تعیین نشده‌اند؛ بنابراین نتایج سیتیرنین به‌عنوان مقادیر حاصل از

استخراج و خالص‌سازی نمونه منتخب

پس از انتخاب بهترین تیمار، محیط کشت تخمیر شده از زیست‌توده قارچی جدا و محلول بدون سلول جمع‌آوری شد. محلول با استفاده از اواپراتور دوار تحت خلأ تغلیظ، خشک و به پودر تبدیل گردید. پس از آن، پودر با هگزان استخراج و عصاره حاصل مجدداً تغلیظ شد. رنگدانه خام با کروماتوگرافی ستونی سیلیکاژل و با استفاده از هگزان و مخلوط‌های هگزان-اتیل استات جداسازی شد. فراکسیون‌ها بر اساس طیف‌سنجی-UV Vis (۷۰۰-۳۰۰ نانومتر) ارزیابی و فراکسیون‌های مشابه ادغام شدند. در نهایت، رنگدانه هدف با اتانول از ستون شسته و جمع‌آوری شد (Mukherjee and Singh, 2011).

آنالیز LC-MS/MS رنگدانه

به منظور شناسایی ترکیبات اصلی رنگدانه قرمز، نمونه خالص‌شده پس از فیلتراسیون از فیلتر غشایی ۰/۲۲ میکرومتر، توسط دستگاه Ultra-High Performance Liquid Chromatography Triple Chromatography متصل به طیف‌سنج جرمی Triple Quadrupole Mass Spectrometer (UHPLC-MS/MS) آنالیز گردید. آنالیز جرمی با استفاده از منبع یونش Electrospray Ionization (ESI) در مد یون مثبت اجرا شد. محدوده اسکن جرمی m/z ۶۰۰-۱۰۰ تنظیم شد و ترکیبات بر اساس زمان بازداری، نسبت جرم به بار (m/z) و الگوی قطعه‌قطعه شدن (MS/MS fragmentation) شناسایی گردید. داده‌ها با نرم‌افزار MassLynx (Waters, USA) پردازش شدند و ترکیبات با مقایسه طیف‌های جرمی و زمان بازداری با داده‌های گزارش‌شده در منابع معتبر شناسایی شدند (Srianta, et al. 2016).

ارزیابی فعالیت‌های زیستی رنگدانه

فعالیت ضد میکروبی رنگدانه خالص‌شده با روش چاهک در آگار و حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و کشندگی (MBC) علیه پاتوژن‌ها تعیین شد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی با آزمون مهار رادیکال DPPH و فعالیت ضد سرطانی با آزمون

MTT روی رده سلولی Caco-2 ارزیابی گردید (Yudiarti, et al. 2019).

نتایج و بحث

میزان رنگدانه تولیدی

نتایج حاصل از اندازه‌گیری شدت رنگدانه در ۱۰ تیمار SmF نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار آماری ($p < 0/05$) بین محیط‌های کشت مختلف بود (شکل ۱a). میزان تولید رنگدانه در این سیستم در محدوده ۳۸/۵۰ (تیمار L3) تا ۷۶/۱۵ واحد جذب بر میلی لیتر (تیمار L6) متغیر بود. مشاهدات نشان داد که افزودن ملاس و کنجاله سویا به عنوان منبع نیتروژن آلی، به‌طور معنی‌داری سرعت سنتز رنگدانه را افزایش می‌دهد (Srianta, et al. 2016). در سیستم تخمیر SSF، بازده تولید رنگدانه به مراتب بالاتر بود تا در سیستم غوطه‌وری. مقادیر رنگدانه تولیدی در این بخش بین ۱۸۵ تا ۳۳۰ AU/g متغیر بود (شکل ۱b). بالاترین غلظت رنگدانه در تیمار S5 (بستر ترکیبی با بالاترین میزان سبوس برنج) به دست آمد. کمترین میزان رنگدانه در تیمار S3 به دست آمد. بر اساس یافته‌های این مطالعه مشخص گردید که تولید رنگدانه توسط *M. purpureus* در SmF و SSF در محدوده‌ای قرار دارد که با مطالعات پیشین قابل مقایسه است و در برخی موارد عملکرد بالاتری نیز نشان می‌دهد. برای مثال، در سیستم غوطه‌وری مقادیر پایین‌تری (۴۵ - ۲۵ AU/mL) گزارش کرده‌اند (Srianta, et al. 2016). در حالی که محیط‌های مبتنی بر ملاس و سبوس برنج در این مطالعه کارایی بیشتری نشان دادند. همچنین، مقدار رنگدانه در تخمیر SSF بیشتر است (Xiong, et al. 2020) و درباره افزایش تولید قارچ‌های رشته‌ای روی بسترهای جامد، دسترسی بهتر را به اکسیژن و فعالیت آبی کمتر نسبت داده‌اند (Chen, et al. 2021). شرایطی که مسیرهای متابولیت‌های ثانویه از جمله تولید رنگدانه را فعال می‌کند (Wang, et al. 2020).

زیست توده تولیدی

قندهای قابل تخمیر مانند گلوکز و فروکتوز انرژی لازم را برای رشد *Monascus* فراهم می‌کند (Srianta, et al. 2016). کنجاله سویا نیز منبع مهمی از نیتروژن، اسیدهای آمینه، پپتیدها و ریزمغذی‌هاست که برای سنتز آنزیم‌ها و رشد قارچ ضروری‌اند (Xiong, et al. 2020). نسبت کربن به نیتروژن نیز نقش کلیدی در تنظیم رشد قارچ‌های رشته‌ای و تولید متابولیت‌های ثانویه دارد (Chen, et al. 2021). در تخمیرSSF، تیمار S5 بیشترین و S3 کمترین زیست‌توده را داشت. رشد بالاتر درSSF ناشی از شباهت این سیستم به شرایط طبیعی قارچ‌های رشته‌ای، ساختار متخلخل بستر، انتقال بهتر اکسیژن و نفوذ مؤثر هیف‌ها در بستر است (De Almeida, et al. 2021). سبوس برنج با داشتن کربوهیدرات، پروتئین، لیپید، ویتامین‌ها و مواد معدنی بستر مناسبی برای رشد *Monascus* محسوب می‌شود و ترکیبات زیست‌فعال و ریزمغذی‌های آن باعث افزایش فعالیت متابولیکی قارچ می‌شود (Srianta, et al. 2020; Wang, et al. 2020; Xiong, et al. 2020). مطالعات پیشین نیز تأیید کرده‌اند که انتقال بهتر اکسیژن و فعالیت آبی پایین‌تر درSSF شرایط مطلوب‌تری برای رشد و تولید متابولیت‌های ثانویه ایجاد می‌کند (Chen, et al. 2025).

میزان سیتترینین تولیدی

میزان سیتترینین در سیستم تخمیر SmF بین ۲/۱۰ تا ۵/۲۴ میلی گرم بر لیتر متغیر بود و به ترتیب کمترین و بیشترین مقدار در تیمارهای L3 و L6 مشاهده شد (شکل ۱e). در مقابل، در سیستمSSF، میزان سیتترینین در محدوده ۱/۶ تا ۵/۱۳ میلی گرم بر کیلوگرم قرار داشت که به طور کلی کمتر بود تا در سیستم SmF (شکل ۱f). به طور کلی کمترین میزان سیتترینین در نمونه S6 به دست آمده است. کاهش تولید سیتترینین درSSF را می‌توان به شرایط مناسب‌تر این سیستم از جمله انتقال بهتر اکسیژن، فعالیت آبی پایین‌تر و تفاوت در وضعیت متابولیکی قارچ نسبت داد (De Almeida, et al. 2021). این شرایط ضمن تقویت رشد و تولید رنگدانه، موجب

در SmF، بیشترین زیست‌توده در تیمار L6 و کمترین مقدار در تیمار L3 به دست آمد (شکل ۱c). این اختلاف به ترکیب منابع کربنی و نیتروژنی مرتبط است؛ تیمارهایی که ملاس و کنجاله سویا بیشتری داشتند (L4، L6، L10) رشد بالاتری نشان دادند. ملاس به عنوان منبع غنی قندهای قابل تخمیر مانند گلوکز و فروکتوز انرژی لازم را برای رشد *Monascus* فراهم می‌کند. کنجاله سویا نیز منبع مهمی از نیتروژن، اسیدهای آمینه، پپتیدها و ریزمغذی‌هاست که برای سنتز آنزیم‌ها و رشد قارچ ضروری‌اند (Keivani and Jahadi, 2022). همچنین، نسبت کربن به نیتروژن نقش کلیدی در تنظیم رشد قارچ‌های رشته‌ای و تولید متابولیت‌های ثانویه دارد (Chen, et al. 2025). محدوده برای تخمیرSSF بین ۱۴/۶ (تیمار S3) تا ۳۱/۸ گرم بر ۱۰۰ گرم (تیمار S5) است. تیمارهای غنی‌شده با سبوس بیشتر (S5، S7، S10) زیست‌توده بیشتری تولید کرده‌اند **Error! Reference source not found.** (شکل ۱d). رشد بالاتر درSSF ناشی از شباهت این سیستم به شرایط طبیعی قارچ‌های رشته‌ای، ساختار متخلخل بستر، انتقال بهتر اکسیژن و نفوذ مؤثر هیف‌ها در بستر است (Chaudhary, et al. 2022). سبوس برنج با داشتن کربوهیدرات، پروتئین، لیپید، ویتامین‌ها و مواد معدنی، بستر مناسبی برای رشد *Monascus* محسوب می‌شود و ترکیبات زیست‌فعال و ریزمغذی‌های آن باعث افزایش فعالیت متابولیکی قارچ می‌شود (Wang, et al. 2020). مطالعات پیشین (Kaur, et al. 2023; Zhang, et al. 2024) نیز تأیید کرده‌اند که انتقال بهتر اکسیژن و فعالیت آبی پایین‌تر درSSF شرایط مطلوب‌تری برای رشد و تولید متابولیت‌های ثانویه ایجاد می‌کند. در SmF، بیشترین زیست‌توده در تیمار L6 و کمترین مقدار در تیمار L3 به دست آمد. این اختلاف به ترکیب منابع کربنی و نیتروژنی مرتبط است؛ تیمارهایی که ملاس و کنجاله سویا بیشتری داشتند رشد بالاتری نشان دادند. ملاس به عنوان منبع غنی

و افزایش تولید رنگدانه را در سیستمSSF گزارش کرده‌اند (Srianta, et al. 2016).

انتخاب تیمار بهینه

با توجه به نتایج تولید رنگدانه، زیست‌توده، میزان سیتیرین و نسبت رنگدانه به سیتیرین، تیمار S6 به عنوان مناسب‌ترین تیمار برای استخراج و خالص‌سازی رنگدانه انتخاب شد. تیمار S5 بیشترین تولید رنگدانه را داشت، اما به دلیل تولید بیشتر سیتیرین انتخاب نشد. عملکرد برتر S6 به ترکیب متعادل منابع کربن و نیتروژن و رطوبت مناسب (۶۸ درصد) نسبت داده شد که با فراهم کردن شرایط مطلوب برای رشد میسلیم و انتقال اکسیژن، تولید رنگدانه را افزایش و همزمان سنتز سیتیرین را کاهش داد (Chen, et al. 2025; Wang, et al. 2020).

بررسی ویژگی‌های نمونه بهینه

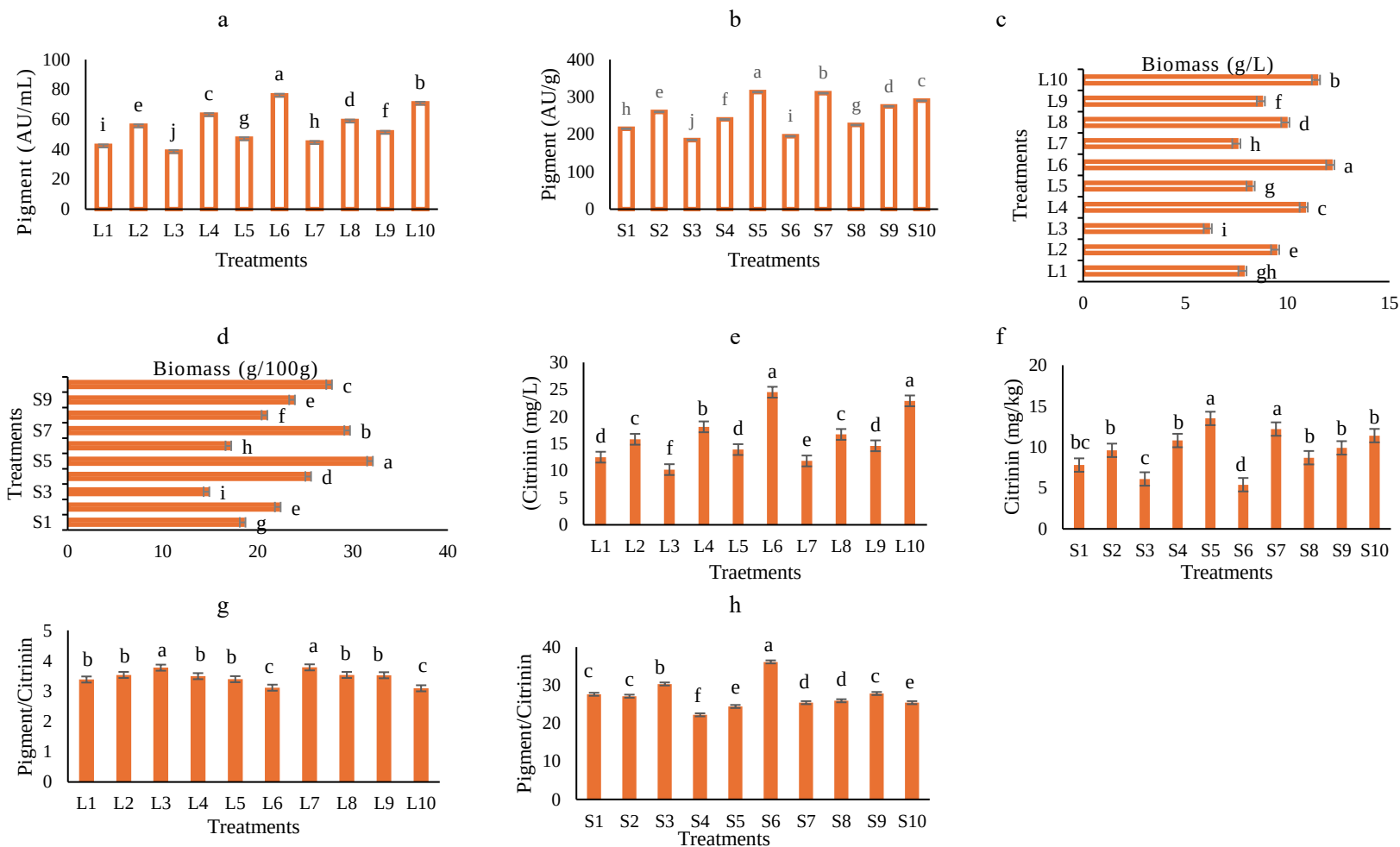
میزان سیتیرین

فرآیند استخراج و خالص‌سازی موجب کاهش معنادار سیتیرین نمونه بهینه S6 از ۴/۵ به ۱/۸ میلی گرم بر کیلوگرم شد (شکل ۲). این افت به تفکیک مؤثر سیتیرین از رنگدانه‌های آزافیلونی در مراحل استخراج حلالی و کروماتوگرافی ستونی سیلیکا ژل نسبت داده می‌شود؛ تفاوت قطبیت و رفتار کروماتوگرافی، جداسازی سیتیرین را تسهیل می‌کند. مقدار نهایی در بازه‌های ایمنی گزارش شده برای فرآورده‌های تخمیری قرار دارد و کارآمدی رویکرد به کاررفته برای تولید رنگدانه با حداقل آلودگی مایکوتوکسینی را تأیید می‌کند. این نتیجه با گزارش‌های استفاده موفق از سیلیکا ژل و حلال‌های آلی برای جداسازی سیتیرین از رنگدانه‌های *Monascus* همخوان است (Marič, et al. 2019; Mukherjee and Singh, 2011).

کاهش فعالیت مسیرهای بیوسنتز سیتیرین می‌شود (Chen, et al. 2025). نتایج این پژوهش با مطالعات اخیر مطابقت دارد که نشان داده‌اند نوع بستر، ترکیب منابع کربن و نیتروژن و شرایط تخمیر از مهم‌ترین عوامل مؤثر بر تولید سیتیرین هستند و استفاده از سیستمSSF می‌تواند به کاهش معنی‌دار این مایکوتوکسین در مقایسه با SmF منجر شود (Chen, et al. 2021; Hsu, et al. 2011; Kaur, et al. 2023).

نسبت رنگدانه/سیتیرین

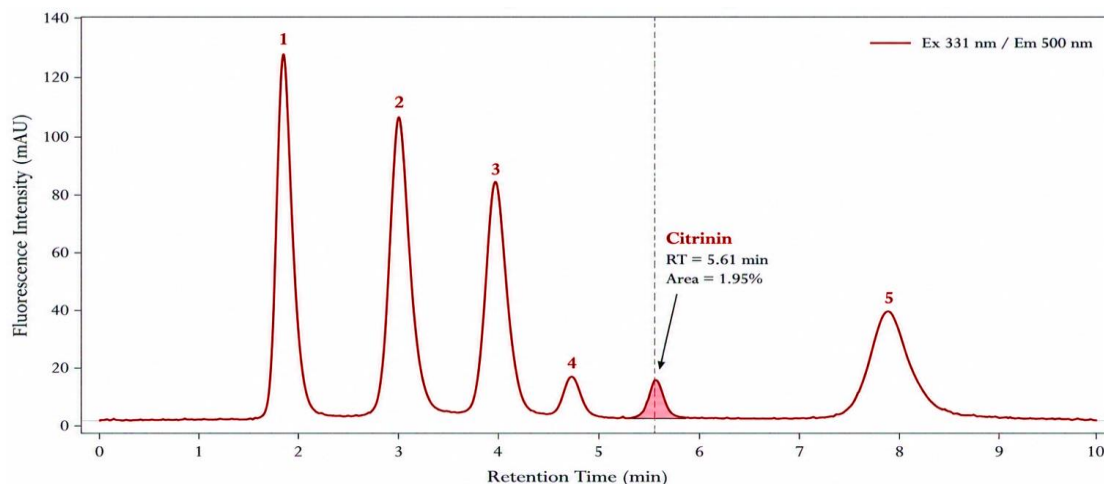
در SmF، نسبت رنگدانه/سیتیرین در محدوده ۳/۰۹ (در تیمار L10) تا ۳/۷۸ (در تیمار L7) قرار گرفت (شکل ۱g). بیشترین نسبت در تیمار L7 مشاهده شد که نشان‌دهنده تولید مناسب رنگدانه همراه با سطح نسبتاً پایین سیتیرین است. کمترین نسبت نیز در تیمار L10 مشاهده شد که به دلیل تولید سیتیرین بالاتر در این تیمار بود. اما بین نمونه‌های L1-L5 و L8-L9 تفاوت معنی‌داری وجود ندارد ($p > 0.05$). در مقابل، در سامانهSSF نسبت رنگدانه به سیتیرین به طور معنی‌داری بیشتر بود تا در سامانه SmF و تیمار S6 بالاترین مقدار این شاخص را نشان داد (شکل ۱h). نسبت بالاتر رنگدانه به سیتیرین، شاخصی از کارایی بیشتر فرآیند تخمیر و تولید همزمان رنگدانه بیشتر با مایکوتوکسین کمتر محسوب می‌شود (Chen, et al. 2025). به نظر می‌رسد انتقال بهتر اکسیژن، فعالیت آبی پایین‌تر و ساختار متخلخل بستر در تخمیر حالت جامد، شار متابولیکی را به سمت سنتز رنگدانه‌های آزافیلونی هدایت خواهد کرد و از تولید سیتیرین جلوگیری می‌کند (De Almeida, et al. 2021). استفاده از سبوس برنج و دیگر ضایعات کشاورزی به عنوان بستر تخمیر، به دلیل تأمین تدریجی منابع کربن و نیتروژن و فراهم کردن شرایط مناسب رشد، موجب افزایش بازده رنگدانه و بهبود کیفیت محصول نهایی می‌شود (Chen, et al. 2021; Liu, et al. 2020) که با نتایج مطالعات اخیر همخوانی دارد که کاهش تجمع سیتیرین



شکل ۱. نمودارها نشان دهنده مقدار رنگدانه در (a) تخمیر در محیط جامد (SmF) و (b) تخمیر در محیط جامد (SSF)، زیست توده در (c) SmF و (d) SSF، مقدار سیتترین در (e) SmF و (f) SSF، و

نسبت رنگدانه به سیتترین در (g) SmF و (h) SSF

Figure 1. The graphs represent the pigment content in (a) SmF, the pigment content in (b) SSF fermentation, the biomass in (c) SmF, the biomass level in (d) SSF, the citrinin content in (e) SmF, the citrinin content in (f) SSF, the pigment-to-citrinin ratio in (g) SmF, and the pigment-to-citrinin ratio in (h) SS



شکل ۲. کروماتوگرام HPLC مربوط به نمونه رنگدانه خالص شده به دست آمده از تیمار S6

Figure 2. The HPLC chromatogram corresponding to the purified pigment sample obtained from the S6 treatment

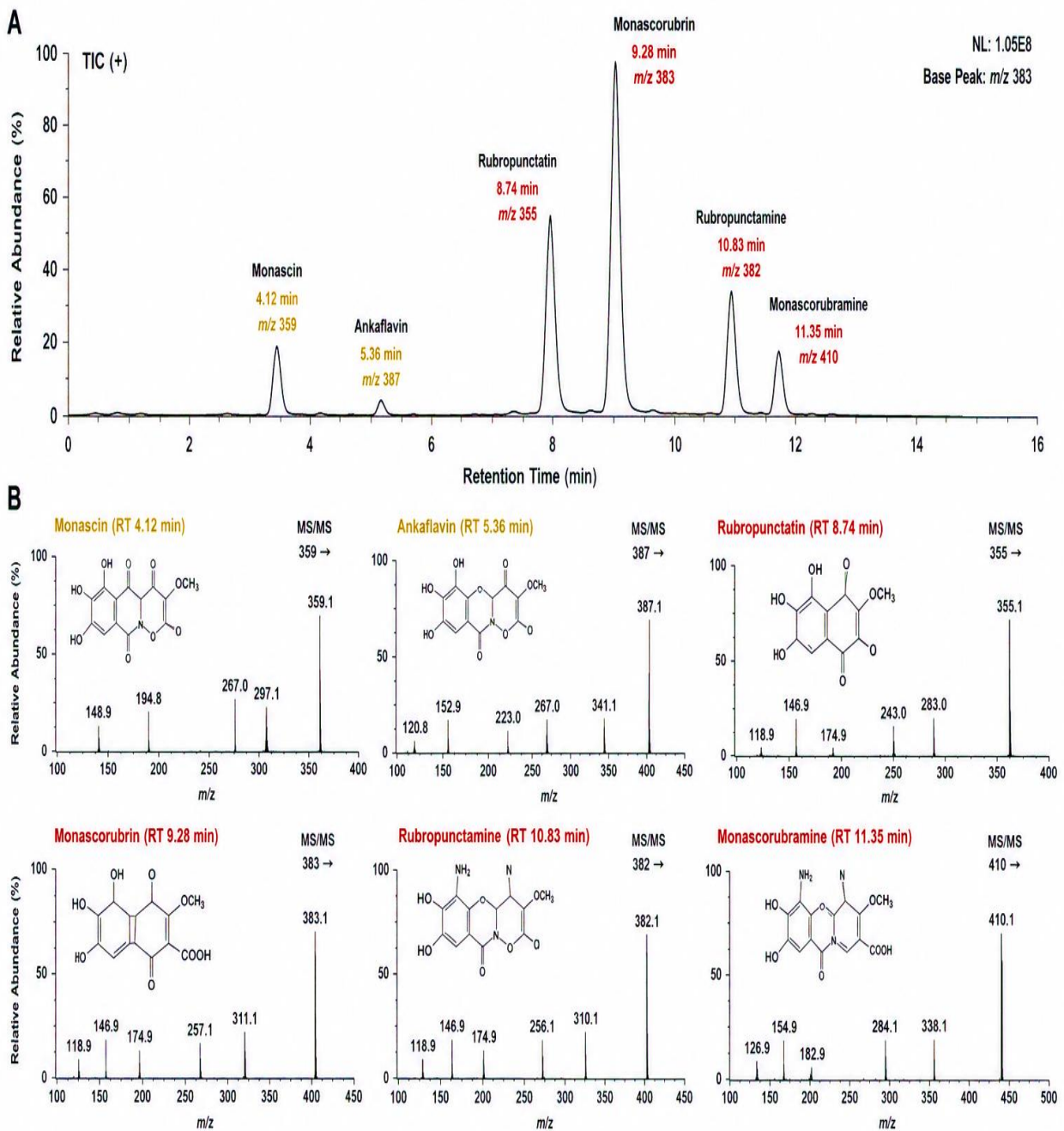
در الگوی تولید رنگدانه‌ها تحت تأثیر ترکیب محیط کشت، نسبت کربن به نیتروژن و شرایط تخمیر قرار دارد (Chen, et al. 2025; Liu, et al. 2020).

در طیف جرمی، یون‌های مولکولی موناسکوروبرین (m/z ۳۸۳)، روبروپونکتاتین (m/z ۳۵۵)، روبروپونکتامین (m/z ۳۸۲) و موناسکوروبرامین (m/z ۴۱۰) با مقادیر گزارش شده در مطالعات پیشین مطابقت دارند که صحت شناسایی ترکیبات و خلوص مناسب رنگدانه استخراج شده را تأیید می‌کند (De Almeida, et al. 2021; Wang, et al. 2020). مشاهده نشدن پیک شاخص سیتترینین یا حضور آن در مقادیر بسیار ناچیز نشان می‌دهد شرایط تخمیر انتخاب شده علاوه بر افزایش تولید رنگدانه، موجب کاهش تولید این مایکوتوکسین نیز شده است (Zhang, et al. 2024). مطالعات اخیر نیز نشان داده‌اند که استفاده از سیستم تخمیر حالت جامد، بسترهای غنی از سبوس برنج و منابع نیتروژن آلی می‌تواند مسیر بیوسنتز رنگدانه‌های آزافیلونی را تقویت کند و به‌طور همزمان تولید سیتترینین را کاهش دهد (Liu, et al. 2020; Xiong, et al. 2020).

نتایج شناسایی ترکیبات رنگدانه با LC-MS/MS

آنالیز LC-MS/MS نشان داد که رنگدانه استخراج شده از *M. purpureus* عمدتاً از ترکیبات خانواده آزافیلون تشکیل شده است (شکل ۳). مهم‌ترین ترکیبات شناسایی شده شامل موناسکوروبرین، روبروپونکتاتین، موناسکوروبرامین و روبروپونکتامین بودند که بر اساس زمان بازداری، نسبت جرم به بار (m/z) و الگوی قطعه‌قطعه شدن شناسایی شدند. همچنین، مقادیر کمتری از رنگدانه‌های زرد شامل موناسین و آنکافلاوین در نمونه مشاهده شد. بیشترین فراوانی نسبی مربوط به موناسکوروبرین (۴۱/۶ درصد) و پس از آن روبروپونکتاتین (۲۸/۳ درصد) بود که نشان می‌دهد رنگدانه‌های قرمز، ترکیبات غالب عصاره تولید شده تحت شرایط تخمیر انتخاب شده هستند. این یافته با نتایج HPLC نیز همخوانی دارد و بیانگر آن است که شرایط بهینه تخمیر و خالص‌سازی موجب افزایش تولید رنگدانه‌های قرمز نسبت به دیگر متابولیت‌ها شده است (Srianta, et al. 2016; Wang, et al. 2020).

فراوانی کمتر موناسین و آنکافلاوین نشان می‌دهد که مسیر بیوسنتزی رنگدانه‌ها در مراحل پایانی بیشتر به سمت تشکیل مشتقات قرمز آزافیلون هدایت شده است. این تغییر



شکل ۳. کروماتوگرام LC-MS/MS رنگدانه‌های استخراج‌شده از *Monascus purpureus* و شناسایی ترکیبات اصلی بر اساس زمان بازداری و نسبت جرم به بار

Figure 3. LC-MS/MS chromatogram of pigments extracted from *Monascus purpureus*, showing the identification of the major compounds based on their retention times and mass-to-charge (m/z) ratios

Compound ترکیب	Retention time (min) زمان بازداری	[M+H] ⁺ (m/z) یون مولکولی پروتون‌دار	Relative abundance (%) فراوانی نسبی
Monascin موناسکین	4.12	359	7.4
Ankaflavin آنکافلاوین	5.36	387	5.9
Rubropunctatin روبروپونکتاتین	8.74	355	28.3
Monascorubrin موناسکوروبرین	9.28	383	41.6
Rubropunctamine روبروپونکتامین	10.83	382	10.2
Monascorubramine موناسکوروبرامین	11.35	410	6.6

نتایج فعالیت ضد میکروبی

مقادیر MIC و MBC برای باکتری‌های اسیدلاکتیک بیشتر از *S. aureus* و کمتر از *P. aeruginosa* بود که نشان می‌دهد رنگدانه اثر مهاري محدودتری بر این باکتری‌های مفید دارد. حساسیت بیشتر باکتری‌های گرم‌مثبت نسبت به گرم‌منفی با ساختار دیواره سلولی آن‌ها قابل توجیه است. وجود لایه خارجی غنی از لیپوپلی‌ساکارید در باکتری‌های گرم‌منفی، نفوذ ترکیبات ضد میکروبی را محدود می‌کند و موجب کاهش حساسیت آن‌ها می‌شود، در حالی که باکتری‌های گرم‌مثبت به دلیل نداشتن این سد خارجی، بیشتر تحت تأثیر ترکیبات آزافیلونی *Monascus* قرار می‌گیرند. این الگوی حساسیت با نتایج مطالعات اخیر مطابقت دارد که فعالیت ضدباکتریایی قوی‌تر رنگدانه‌های *Monascus* را علیه *S. aureus* و سایر باکتری‌های گرم‌مثبت گزارش کرده‌اند (Chen, et al. 2016; Feng, et al. 2019; Liu, et al. 2020).

مقادیر MIC و MBC به‌دست‌آمده در این پژوهش نیز در محدوده گزارش‌شده در مطالعات پیشین قرار دارد. پژوهش‌های اخیر نشان داده‌اند که رنگدانه‌های قرمز *Monascus* در غلظت‌های پایین قادر به مهار رشد *S. aureus* هستند، در حالی که برای مهار کامل باکتری‌های گرم‌منفی، به‌ویژه *P. aeruginosa*، به غلظت‌های بالاتری نیاز

نتایج آزمون انتشار در چاهک نشان داد که رنگدانه قرمز خالص‌شده *M. purpureus* علیه تمامی میکروارگانیسم‌های مورد بررسی فعالیت ضد میکروبی دارد، اما شدت این فعالیت بین سویه‌ها به‌طور معنی‌داری (0/05 < p) متفاوت است (جدول ۳). بیشترین قطر هاله عدم رشد در *Staphylococcus aureus* (0/8 ± ۱۷/۲ میلی‌متر) و کمترین مقدار در باکتری‌های اسیدلاکتیک (0/۴ ± ۹/۵ میلی‌متر) مشاهده شد. در میان باکتری‌های گرم‌منفی، *Escherichia coli* و *Salmonella typhimurium* حساسیت مشابهی به رنگدانه نشان دادند، در حالی که *Pseudomonas aeruginosa* مقاوم‌ترین سویه بود. اگرچه قطر هاله‌های ایجادشده توسط رنگدانه کمتر از آنتی‌بیوتیک‌های مرجع بود، اما اختلاف‌های مشاهده‌شده از نظر آماری معنی‌دار و بیانگر توانایی این رنگدانه در مهار رشد باکتری‌های بیماری‌زا است.

نتایج MIC و MBC نیز با آزمون انتشار در چاهک همخوانی داشت (جدول ۳). کمترین مقادیر MIC و MBC به‌ترتیب ۳ ± ۶۲/۵ و ۵ ± ۱۲۵ µg/mL برای *S. aureus* و بیشترین مقادیر به‌ترتیب ۱۰ ± ۲۵۰ و ۱۰ ± ۵۰۰ µg/mL برای *P. aeruginosa* به‌دست آمد (0/05 < p). همچنین،

است. این تفاوت به ویژگی‌های ساختاری غشای خارجی و فعالیت پمپ‌های خروجی (efflux pumps) در باکتری‌های گرم منفی نسبت داده شده است. علاوه بر این، گزارش شده است که ترکیبات آزا فیلونی با ایجاد اختلال در یکپارچگی غشای سلولی، مهار آنزیم‌های تنفسی و افزایش گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)، موجب کاهش رشد و مرگ سلولی باکتری‌ها می‌شوند (Chaudhary, et al. 2022; Keivani, et al. 2024; and Jahadi, 2022; Zhang, et al. 2024).

نتایج آزمون‌های آنتی‌اکسیدانی و ضدسرطانی

مهار رادیکال DPPH از ۲۱/۳ تا ۷۲/۴ درصد با افزایش غلظت رنگدانه افزایش یافت و IC_{50} برابر ۰/۴۲ میلی گرم بر میلی لیتر محاسبه شد (شکل ۴a). این نتایج با دامنه‌های گزارش شده برای رنگدانه‌های قرمز *Monascus* همخوان است و نقش ساختارهای فنولی و کونژوگه آزا فیلون‌ها در اهدای الکترون و خنثی‌سازی رادیکال‌ها را تأیید می‌کند (Feng, et al. 2019; Xie, et al. 2022). کاهش سیتترینین به‌عنوان ترکیب بالقوه پرو-اکسیدانی پس از خالص‌سازی می‌تواند به بهبود کارایی آنتی‌اکسیدانی کمک کرده باشد (Hsu, et al. 2011).

آزمون MTT روی رده Caco-2 کاهش وابسته به دوز در زنده‌مانی را نشان می‌دهد به طوری که ۸۸ درصد زنده‌مانی در ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر و ۳۹ درصد زنده‌مانی در ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر و همچنین IC_{50} برابر ۱۴۵/۵۱ میکروگرم بر میلی لیتر بیانگر سیتوتوکسیسیته متوسط اما معنی‌دار است (شکل ۴b).

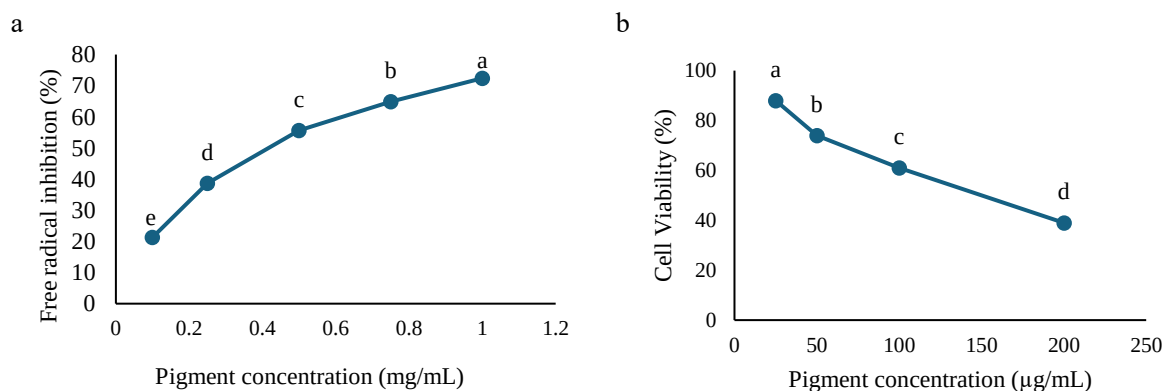
مسیرهای مکانیسمی پیشنهادی شامل افزایش ROS، القای آپوپتوز (تغییر نسبت BAX/BCL-۲ و فعال‌سازی CASPASE-۳/۹)، توقف چرخه و مهار مسیرهای PI3K/AKT و MAPK/ERK است (Kaur, et al. 2023; Lin, et al. 2023). بهبود پروفایل ایمنی پس از کاهش سیتترینین مؤید انتساب اثرهای زیستی عمدتاً به رنگدانه‌های هدف است (Zhang, et al. 2024). اگرچه رنگدانه مورد مطالعه اثر ضدتکثیری قابل توجهی بر رده سلولی Caco-2 نشان داد، این یافته به‌تنهایی برای اثبات انتخاب‌پذیری سمیت علیه سلول‌های سرطانی یا ایمنی رنگدانه کافی نیست. از آنجا که در مطالعه حاضر سمیت سلولی روی یک رده سلولی نرمال و غیرسرطانی بررسی نشد، امکان محاسبه شاخص انتخاب‌پذیری (Selectivity Index, SI) وجود نداشت. برای ارزیابی دقیق‌تر اختصاصی بودن اثر ضدسرطانی، لازم است در مطالعات آینده اثر رنگدانه به‌طور موازی بر یک رده سلولی نرمال مناسب، ترجیحاً با منشأ مرتبط با بافت هدف، بررسی و IC_{50} در هر دو رده تعیین شود. پس از آن، مقایسه IC_{50} سلول‌های نرمال و سرطانی می‌تواند مبنای محاسبه SI و ارزیابی انتخاب‌پذیری اثر سیتوتوکسیک باشد. بنابراین، نتایج حاضر باید صرفاً به‌عنوان شواهد اولیه‌ای از فعالیت ضدتکثیری رنگدانه در سلول‌های Caco-2 تلقی شود و برای نتیجه‌گیری درباره ایمنی یا قابلیت کاربرد خوراکی و دارویی، به ارزیابی‌های تکمیلی سمیت و انتخاب‌پذیری نیاز است.

جدول ۳. فعالیت ضد میکروبی رنگدانه قرمز خالص شده *M. purpureus* بر اساس آزمون انتشار در چاهک، همراه با حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت باکتری‌کشی (MBC) علیه میکروارگانیسم‌های مورد بررسی

Table 3. Antimicrobial activity of purified *M. purpureus* red pigment determined by the agar well diffusion assay, together with the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) against the tested microorganisms

Microorganism میکروارگانیسم	Pigment رنگدانه (mm)	Chloramphenicol کلرامفنیکل (mm)	Gentamicin جنتامایسین (mm)	Penicillin پنی‌سیلین (mm)	MIC حداقل غلظت مهارى (µg/mL)	MBC حداقل غلظت باکتری‌کشی (µg/mL)
<i>S. aureus</i> استافیلوکوکوس اورئوس	17.2 ^a ± 0.8	25.6 ^a ± 0.9	23.4 ^a ± 0.7	19.5 ^a ± 0.8	62.5 ^d ± 3	125 ^d ± 5
<i>E. coli</i> اشریشیا کلی	13.6 ^b ± 0.7	24.2 ^a ± 0.8	22.7 ^a ± 0.6	12.4 ^b ± 0.5	125 ^c ± 5	250 ^c ± 10
<i>Salmonella</i> سالمونلا	12.9 ^b ± 0.4	23.5 ^{ab} ± 0.7	21.9 ^{ab} ± 0.5	11.6 ^{bc} ± 0.6	125 ^c ± 5	250 ^c ± 10
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> سودوموناس آئروژینوزا	10.8 ^c ± 0.4	21.4 ^b ± 0.6	20.6 ^b ± 0.7	10.2 ^c ± 0.4	250 ^a ± 10	500 ^a ± 10
LAB باکتری‌های اسیدلاکتیک	9.5 ^d ± 0.4	18.3 ^c ± 0.5	16.7 ^c ± 0.6	14.6 ^a ± 0.5	200 ^b ± 5	300 ^b ± 15

مقادیر به صورت میانگین ± انحراف معیار (n = 3) بیان شده‌اند. حروف بالانویس متفاوت (a-d) نشان‌دهنده تفاوت‌های آماری معنی‌دار بین سویه‌های مورد آزمایش هستند
Values are represented as mean ± standard deviation (n = 3). Distinct superscript letters (a-d) show statistically significant differences among the tested strains



شکل ۴. اثر غلظت‌های مختلف رنگدانه قرمز تولیدشده توسط *Monascus purpureus* بر (a) فعالیت آنتی‌اکسیدانی بر اساس درصد مهار رادیکال آزاد DPPH و (b) زنده‌مانی سلول‌های Caco-2 به‌منظور ارزیابی اثر سمیت سلولی

Figure 4. Effect of different concentrations of the red pigment produced by *Monascus purpureus* on (a) antioxidant activity, expressed as the percentage of DPPH free radical scavenging, and (b) Caco-2 cell viability for the evaluation of cytotoxicity

زیستی با ارزش افزوده دارد. مقایسه دو سامانه تخمیر بیانگر

پژوهش حاضر نشان داد که قارچ *M. purpureus* برتری SSF نسبت به SmF از نظر بازده رنگدانه، صرفه

توان بالایی در تبدیل ضایعات کشاورزی به رنگدانه‌های اقتصادی و کاهش چشمگیر تولید سیتترینین بود. تیمار S6

نتیجه‌گیری

با ترکیب متعادل سبوس برنج، پودر ذرت، کنجاله سویا و ملاس بهترین عملکرد را داشت و با ایجاد توازن مناسب کربن به نیتروژن، سنتز رنگدانه را تقویت و تولید سیتترینین را مهار کرد. فرآیند استخراج و خالص سازی مبتنی بر کروماتوگرافی، غلظت سیتترینین را به کمتر از حد مجاز جهانی (۲ میلی گرم بر کیلوگرم) کاهش داد و نتایج HPLC و LC-MS/MS نیز خلوص و ترکیب مناسب رنگدانه تولیدی را تأیید کردند. رنگدانه خالص شده علاوه بر خاصیت رنگ‌دهندگی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی، اثر ضدسرطانی بر سلول‌های Caco-2 و فعالیت ضد میکروبی گسترده نشان داد. با این حال، پژوهش در مقیاس آزمایشگاهی، بررسی تنها یک سویه از *M. purpureus* و ارزیابی نشدن پایداری رنگدانه در شرایط واقعی فرآوری و نگهداری مواد غذایی از محدودیت‌های این مطالعه بود. از این رو، پرداختن به مطالعات در مقیاس پایلوت و صنعتی، بررسی سمیت درون تنی و ارزیابی پایداری رنگدانه در فرمولاسیون‌های مختلف غذایی ضروری است. در مجموع، نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که استفاده از ضایعات کشاورزی در تخمیر حالت جامد رویکردی است پایدار، اقتصادی و امیدوارکننده برای تولید صنعتی رنگدانه‌های طبیعی، ایمن و چندمنظوره *Monascus* با حداقل تولید سیتترینین.

تعارض منافع

نگارندگان این مقاله اعلام می‌دارند که در خصوص نگارش و چاپ مقاله، هیچ گونه تعارض منافی وجود ندارد.

منابع

- Chaudhary, V. Katyal, P. Poonia, A. K. Kaur, J. Puniya, A. K. and Panwar, H. 2022. Natural pigment from *Monascus* : The production and therapeutic significance. *Journal of Applied Microbiology*, 133(1), 18–38. <https://doi.org/10.3390/10.1111/jam.15308>
- Chen, D. Xu, Y. Li, H. and Zhu, X. 2025. Optimization of *Monascus purpureus* culture conditions in rice bran for enhanced *Monascus* pigment biosynthesis. *Fermentation*, 11(9), 505. <https://doi.org/10.3390/fermentation11090505>
- Chen, X. Yan, J. Chen, J. Gui, R. Wu, Y. and Li, N. 2021. Potato pomace: An efficient resource for *Monascus* pigments production through solid-state fermentation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 132(2), 167–173. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2021.03.007>
- De Almeida, A. B. Santos, N. H. De Lima, T. M. Santana, R. V. De Oliveira Filho, J. G. Peres, D. S. and Egea, M. B. 2021. Pigment bioproduction by *Monascus purpureus* using corn bran, a byproduct of the corn industry. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 32, 101931. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.101931>
- Feng, L. Li, Y. Sun, G. and Zhao, X. 2019. Antibacterial effect of orange *Monascus* pigment against *Staphylococcus aureus*. *Acta Alimentaria*, 48(2), 169–176. <https://doi.org/10.1556/066.2019.48.2.4>
- Gong, P. Shi, R. Liu, Y. Luo, Q. Wang, C. and Chen, W. 2023. Recent advances in *Monascus* pigments produced by *Monascus purpureus*: Biosynthesis, fermentation, function, and application. *LWT*, 185, 115162. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.115162>
- Hosseini, M. and Karamali, S. 2026. Investigation of physicochemical and antimicrobial properties of edible film based on whey protein-gelatin containing coriander extract. *Food Engineering Research*, 24(2), 67–82. <https://doi.org/10.22092/fooder.2026.369298.1421>
- Hsu, L. C. Hsu, Y. W. Liang, Y. H. Kuo, Y. H. and Pan, T. M. 2011. Anti-tumor and anti-inflammatory properties of ankaflavin and monaphilone A from *Monascus purpureus* NTU 568. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(4), 1124–1130. <https://doi.org/10.1021/jf103652n>

- Huang, Y. Chen, J. Chen, Q. and Yang, C. 2023. Effects of main nutrient sources on improving *Monascus* pigments and saccharifying power of *Monascus purpureus* in submerged fermentation. *Fermentation*, 9(7), 696-710. <https://doi.org/10.3390/fermentation9070696>
- Kaur, M. Goel, M. Mishra, R. C. Lahane, V. Yadav, A. K. and Barrow, C. J. 2023. Characterization of the red biochromes produced by the endophytic fungus *Monascus purpureus* CPEF02 with antimicrobial and antioxidant activities. *Fermentation*, 9(4), 328-350. <https://doi.org/10.1018/2023.101201>
- Keivani, H. and Jahadi, M. 2022. Solid-state fermentation for the production of *Monascus* pigments from soybean meals. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 46, 102531. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102531>
- Lin, T. S. Chiu, S. H. Chen, C. C. and Lin, C. H. 2023. Investigation of monacolin K, yellow pigments, and citrinin production capabilities of *Monascus purpureus* and *Monascus ruber* (*Monascus pilosus*). *Journal of Food and Drug Analysis*, 31(1), 85-94. <https://doi.org/10.38212/2224-6614.3438>
- Liu, J. Luo, Y. Guo, T. Tang, C. Chai, X. Zhao, W. Bai, J. and Lin, Q. 2020. Cost-effective pigment production by *Monascus purpureus* using rice straw hydrolysate as substrate in submerged fermentation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 129(2), 229-236. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2019.08.007>
- Marič, A. Skočaj, M. Likar, M. Sepčič, K. Cigić, I. K. Grundner, M. and Gregori, A. 2019. Comparison of lovastatin, citrinin and pigment production of different *Monascus purpureus* strains grown on rice and millet. *Journal of Food Science and Technology*, 56, 3364-3373. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03820-8>
- Mou, L. Pan, R. Jiang, W. Zhang, W. Xin, F. Jiang, Y. and Jiang, M. 2023. Strategies on improvement of pigment formation and reduction of citrinin in *Monascus* fermentation. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 17(1), 261-272. <https://doi.org/10.1002/bbb.2437>
- Mukherjee, G. and Singh, S. K. 2011. Purification and characterization of a new red pigment from *Monascus purpureus* in submerged fermentation. *Process Biochemistry*, 46(1), 188-192. <https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2010.08.006>
- Srianta, I. Zubaidah, E. Estiasih, T. and Yamada, M. 2016. Comparison of *Monascus purpureus* growth, pigment production and composition on different cereal substrates with solid state fermentation. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 7, 181-186. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2016.05.011>
- Tabrizi, N. and Zomorodi, S. 2026. Beyond Surface sterilization: shaping the future of stone fruit preservation with cold plasma through deciphering its interactions with fruit physiology. *Food Engineering Research*, 25(1), 63-82. <https://doi.org/10.22092/fooder.2026.370471.1430>
- Wang, Y. Gao, H. Xie, J. Li, X. and Huang, Z. 2020. Effects of some flavonoids on the mycotoxin citrinin reduction by *Monascus aurantiacus* Li AS3. 4384 during liquid-state fermentation. *Amb Express*, 10(1), 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.01.045>
- Xie, L. Huang, Z. Meng, H. Shi, X. and Xie, J. 2022. Immunomodulation effect of polysaccharides from liquid fermentation of *Monascus purpureus* 40269 via membrane TLR-4 to activate the MAPK and NF- κ B signaling pathways. *International Journal of Biological Macromolecules*, 201, 480-491. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.01.045>
- Xiong, X. Zhen, Z. Liu, Y. Gao, M. Wang, S. Li, L. and Zhang, J. 2020. Low-frequency magnetic field of appropriate strengths changed secondary metabolite production and Na⁺ concentration of intracellular and extracellular *Monascus purpureus*. *Bioelectromagnetics*, 41(4), 289-297. <https://doi.org/10.1002/bem.22262>
- Yudiarti, T. Sugiharto, S. Isroli, I. Widiastuti, E. Wahyuni, H. I. and Sartono, T. A. 2019. Effect of fermentation using *Chrysonillia crassa* and *Monascus purpureus* on nutritional quality, antioxidant, and antimicrobial activities of used rice as a poultry feed ingredient. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*, 6(2), 168-180. <https://doi.org/10.5455/javar.2019.f328>
- Zhang, C. Sun, Q. Yang, L. Ablimit, A. Dong, H. Wang, H. Wang, C. and Wang, C. 2024. Mutation breeding of *Monascus* to produce a high yield of orange pigment and low citrinin content using the artp method. *Journal of Fungi*, 10(8), 553-570. <https://doi.org/10.3390/jof10080553>

Original Research

Optimization of *Monascus* Culture Medium Compositions Using Agro-Industrial Wastes for Maximizing Azaphilone Pigment Production with Minimal Citrinin Content

Marjan Nouri*

*Corresponding Author: Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Ro.C., Islamic Azad University, Roudehen, Iran

Email: Marjan.nouri@iau.ac.ir

Received: 23 August 2026 Accepted: 22 September 2026

[http://doi: 10.22092/fooder.2026.374043.1477](http://doi.org/10.22092/fooder.2026.374043.1477)

Abstract

Natural pigments of the azaphilone family produced by species of *Monascus* are considered ideal alternatives to synthetic colorants in the food, pharmaceutical, and cosmetic industries due to their biological properties and coloring capabilities. This study aimed to produce azaphilone pigments from *Monascus purpureus* using agricultural and industrial wastes, reduce citrinin production, and evaluate the pigment biological properties. Pigment production was investigated under submerged fermentation (SmF) and solid-state fermentation (SSF) using rice bran, corn powder, soybean meal, and molasses as the main carbon and nitrogen sources. Temperature, pH, and aeration were evaluated to achieve maximum pigment yield, and preliminary purification of the extracts was performed. Pigment production in SmF ranged from 38.5 to 76.15 AU/mL, whereas for SSF was 185 to 330 AU/g. Biomass production in SmF ranged from 1.6 to 12 g/L, while SSF was 14.6 to 31.8 g/100 g. Citrinin concentrations in SmF and SSF ranged from 10.2 to 24.5 mg/L and 6.1 to 13.5 mg/kg, respectively. The pigment-to-citrinin ratio was significantly higher in SSF than in SmF. S6, consisting of rice bran, corn powder, soybean meal, and molasses at 50%, 30%, 15%, and 5%, respectively, was selected as the optimum treatment. The purified pigment exhibited desirable antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*, significant antioxidant activity ($IC_{50} = 0.42$ mg/mL), and an antiproliferative effect against Caco-2 cells ($IC_{50} = 145.51$ μ g/mL). The results demonstrated that solid-state fermentation using agricultural and industrial wastes is an efficient approach for the production of natural *Monascus* pigments and has considerable commercialization in the food, pharmaceutical, and biotechnology industries.

Keywords: Solid-state fermentation, Citrinin, Antioxidant activity, Antimicrobial activity

[http://doi: 10.22092/fooder.2026.374043.1477](http://doi.org/10.22092/fooder.2026.374043.1477)

Email: Marjan.nouri@iau.ac.ir

نویسنده مسئول:



© 2026, The Author(s). Published by [Agricultural Engineering Research Institute](#). This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>). Which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.