

Khảo sát khả năng tạo sắc tố, Lovastatin và độc tố Citrinin của hai chủng nấm mốc đỏ *Monascus purpureus*

Lê Đức Mạnh*

Viện Công nghiệp Thực phẩm, 301 Nguyễn Trãi, Thanh Xuân, Hà Nội, Việt Nam

Nhận ngày 5 tháng 9 năm 2007

Tóm tắt. *Monascus purpureus* được sử dụng rộng rãi tại Trung Quốc, Hàn Quốc và Nhật Bản từ hàng trăm năm nay trong sản xuất thực phẩm và trong y học cổ truyền. Gần đây *Monascus* được phát hiện là có khả năng sinh tổng hợp lovastatin, một dược chất quan trọng trong điều trị các bệnh tim mạch. Nghiên cứu này đề cập tới khả năng ứng dụng công nghệ của 2 chủng nấm *Monascus* có mặt trong sưu tập giống của Viện Công nghiệp Thực phẩm là *M. purpureus* MD và *M. purpureus* 3403. Kết quả đánh giá cho thấy hai chủng có những khác biệt rõ rệt về khả năng và dạng sắc tố tạo ra. Trong 2 chủng khảo sát, *M. purpureus* 3403 có khả năng sinh tổng hợp lovastatin và do vậy có tiềm năng ứng dụng trong sản xuất thực phẩm chức năng. Cả hai chủng khảo sát đều có khả năng sinh citrinin, một loại độc tố nấm. Mặc dù không sản sinh ở mức độ cao, sự có mặt của citrinin là điều đáng quan tâm khi ứng dụng *Monascus* trong sản xuất.

1. Mở đầu

Monascus purpureus thuộc ngành Ascomycota, lớp Ascomycetes, phân lớp Eurotiomycetidae và họ Monascaceae. *Monascus* được sử dụng rộng rãi trong sản xuất thực phẩm tại Trung Quốc, Hàn Quốc và Nhật Bản từ hàng trăm năm nay [1]. Ngoài ứng dụng thông thường làm phẩm màu thực phẩm, *Monascus* còn là một loại dược liệu cổ truyền tại các quốc gia này. Gạo lên men với *Monascus* được gọi là "Ang Khak" hoặc "Hong Qu" theo tiếng Trung Quốc, "Ben-Koji" theo tiếng Nhật và "Red Rice Yeast" theo tiếng Anh.

Gần đây, nấm *Monascus* được phát hiện có chứa các hoạt chất có lợi cho hoạt động của tim mạch. Chúng có khả năng làm giảm cholesterol

tổng số, tăng HDL, giảm LDL và triglyceride. Hoạt chất chính điều khiển quá trình này là lovastatin (monacolin K, mevicolin). Do có khả năng làm giảm lượng cholesterol trong máu, *Monascus* có tác dụng phòng ngừa bệnh tim mạch và một số dạng biến chứng [2,3]. Hiện nay các chế phẩm từ *M. purpureus* được sản xuất rộng rãi trên thế giới. Các chế phẩm này có thể bao gồm *M. purpureus* dạng thô, dịch chiết *M. purpureus*, và các chất tinh chế từ chúng. Sản phẩm nếu ở dạng thực phẩm chức năng thường chứa hàm lượng lovastatin từ 90 mg -10.000 mg/kg. Các chế phẩm được áp dụng ở dạng viên nén, con nhộng, dạng kem và dạng bổ sung cho thực phẩm. Chế phẩm của *M. purpureus* tồn tại cả ở dạng thực phẩm chức năng và dược liệu. Solaray (Mỹ), InVite Health (Mỹ), Morning Star Health (Mỹ), TerraVita (Balan), AllOk GmbH (Đức), Hangzhou Gosun Technologies Co., Ltd. (Trung Quốc), YBS

*ĐT: 84-4-8584481.

E-mail: manh@firi.ac.vn

(Nhật)...là một số trong nhiều công ty cung cấp thực phẩm chức năng và dược liệu từ *M. purpureus*.

Một trong những vấn đề quan ngại khi ứng dụng *Monascus* là khả năng sinh độc tố citrinin. Citrinin là độc tố nấm điển hình, được phát hiện đầu tiên ở *Penicillium*, sau đó là *Aspergillus* và *Monascus*. Nó được coi là độc tố khá mạnh nhưng không bền nhiệt và dễ bị phân huỷ trong quá trình chế biến [4]. Citrinin là sản phẩm trao đổi thứ cấp của *Monascus purpureus* nhưng với nồng độ rất nhỏ có thể chấp nhận được trong gạo lên men với *Monascus*.

Mục tiêu của nghiên cứu này là đánh giá khả năng tạo sắc tố, sinh tổng hợp lovastatin và citrinin của 2 chủng nấm *M. purpureus* hiện đang lưu giữ tại Suu tập giống vi sinh vật, Viện Công nghiệp Thực phẩm nhằm tạo tiền đề cho việc phát triển các chế phẩm thực phẩm chức năng từ *Monascus*.

2. Nguyên vật liệu và phương pháp

Chủng giống, môi trường nuôi cấy và phân tích hàm lượng chất màu

Các chủng *M. purpureus* MD và *M. purpureus* 3403 phục vụ nghiên cứu được lấy từ Suu tập giống Vi sinh vật, Viện Công nghiệp Thực phẩm. Giống được bảo quản trong ống thạch nghiêng với thành phần malt 1%, glucose 1%, agar 2%. Khảo sát về khả năng tạo sắc tố, lovastatin, citrinin được thực hiện trên môi trường gạo hấp. Chất màu được trích ly từ sinh khối *Monascus* và giá thể bằng cồn 70% (v/v). Hàm lượng sắc tố được đánh giá thông qua mật độ quang ở bước sóng 410 nm. Phổ màu của các chủng được phân tích bằng sắc ký bản mỏng (silica gel 60, Merck) với dung môi là ethylacetate [5].

Phân tích lovastatin

Để tạo dung dịch chất chuẩn, lovastatin của Molekula (Dorset, Anh) được chuyển hóa thành

dạng axit bằng cách pha trong dung dịch NaOH 0,1M:acetonitril (6:4 v/v). Lovastatin từ nấm *Monascus* được tách chiết bằng cách đông khô sinh khối cùng giá thể của nấm trên môi trường gạo hấp. Hỗn hợp được nghiền mịn và chuyển 0,1 g vào ống Eppendorf chứa 0,5 ml H₂SO₄ 0,1M. Các ống được ủ qua đêm ở nhiệt độ 55°C trong điều kiện lắc 1000 vòng/phút trên máy Thermocomfort (Eppendorf). Sau đó 0,75 ml toluene được bổ sung vào mỗi ống, lắc ở tốc độ 1400 vòng/phút ở nhiệt độ 55°C trong 10 phút và sau đó ly tâm ở 13000 vòng/phút trong 5 phút ở nhiệt độ phòng. Toàn bộ phần dịch nổi được chuyển sang ống mới và trung hòa bằng cách bổ sung 0,5 ml Na₂CO₃ 5%, lắc mạnh trong 1 phút trên máy Vortex. Hỗn hợp được ly tâm ở 13000 vòng/phút trong 1 phút và loại bỏ toàn bộ lớp dưới. Dịch chiết tiếp tục được rửa bằng cách bổ sung 0,5 ml nước cất, lắc mạnh trong 1 phút và ly tâm ở 13000 vòng/phút trong 1 phút. Dung môi toluene được loại bỏ bằng cách chuyển 100µl sang ống mới và làm khô bằng dòng khí nitơ. Phần đọng lại được hòa tan trong 200 µl hỗn hợp dung môi acetonitril: H₃PO₄ 0.1% (60:40, v/v). Hỗn hợp sau đó được ly tâm ở 13000 vòng/phút và sử dụng 5µl dịch nổi để phân tích bằng HPLC với cột hỗn hợp C2-C18 (5RPC và µRPC, Pharmacia Biotech, Mỹ), pha động acetonitrile: H₃PO₄ 0.1% (60:40) (Merck, Đức), tốc độ dòng 0,6 ml/phút. Tín hiệu được ghi nhận bằng detector * SPD 6AV (Shimadzu, Nhật) ở bước sóng 238 nm và phân tích bằng integrator C-R5A (Shimadzu, Nhật).

Phân tích citrinin

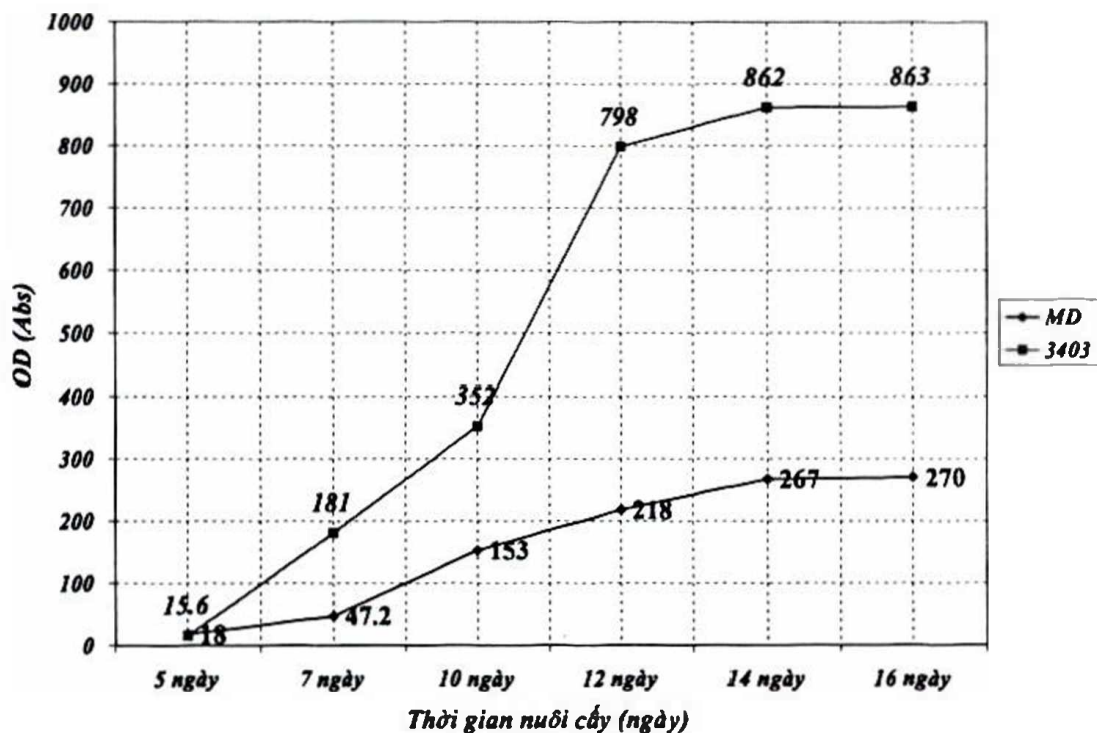
Chất chuẩn citrinin của Molekula (Dorset, Anh) được pha trong dung môi acetonitrile. Citrinin được tách chiết từ sinh khối cùng giá thể nấm trên môi trường cám gạo bằng cồn 67% (v/v). Các mẫu được pha loãng đến nồng độ cần thiết sử dụng cồn 67% và sau đó phân tích bằng HPLC với cùng điều kiện như phân tích lovastatin.

3. Kết quả và bàn luận

Đặc điểm và động học của quá trình sinh sắc tố

Hai chủng *M. purpureus* MD và *M. purpureus* 3403 được nuôi cấy trên môi trường gạo hấp ở 30 °C trong thời gian 16 ngày. Tốc độ phát triển và tạo sắc tố được đánh giá trong suốt quá trình nuôi cấy. Kết quả cho thấy chủng

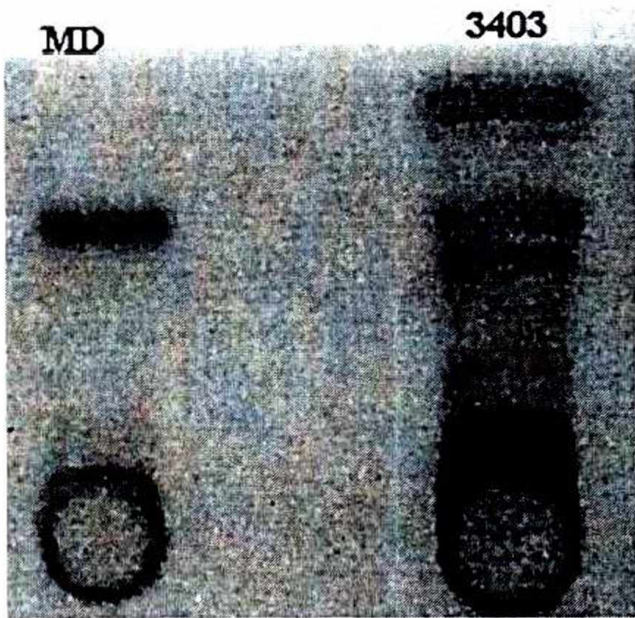
M. purpureus MD phát triển nhanh hơn và tạo sắc tố sớm hơn chủng *M. purpureus* 3403, tuy nhiên cường độ màu của chủng *M. purpureus* 3403 lại cao hơn so với chủng *M. purpureus* MD. Đối với cả 2 chủng giống, hàm lượng sắc tố tích tụ được tăng mạnh trong 12 ngày đầu và sau đó ổn định cho tới cuối thời gian khảo sát (16 ngày) (Hình 1).



Hình 1. Động học của quá trình sinh sắc tố của *Monascus* trên môi trường gạo hấp.

Về thành phần của sắc tố, dịch chiết sắc tố của 2 chủng *M. purpureus* MD và *M. purpureus* 3403 được phân tích bằng phương pháp sắc ký bản mỏng với dung môi tách chiết là ethyl acetat (Hình 2). Chủng *M. purpureus* 3403 có xu hướng sinh sắc tố vàng nhiều hơn (gạo có màu đỏ sậm), trong khi chủng *M. purpureus* MD có xu hướng sinh sắc tố đỏ nhiều hơn (gạo có màu đỏ tươi). Khi trích ly bằng dung môi ethanol, chủng *M. purpureus* 3403 cho dịch chiết có mẫu đỏ sẫm và chủng *M. purpureus* MD cho dịch chiết màu đỏ nhạt hơn. Dựa trên quang phổ quét từ bước sóng λ 300 đến 800 nm ta thấy khả năng sinh tổng hợp sắc tố của hai

chủng là rất khác nhau. Phân tích phổ màu bằng sắc ký bản mỏng cho thấy chủng *M. purpureus* 3403 có khả năng sinh tổng hợp cả 3 nhóm sắc tố chủ yếu của *Monascus purpureus* là màu vàng, màu đỏ và màu da cam trong khi đó chủng *Monascus purpureus* MD lại chỉ tổng hợp chủ yếu một nhóm sắc tố đỏ tía. Như vậy, tùy thuộc vào mục đích sử dụng mà ta có thể lựa chọn một trong 2 chủng *Monascus*. Sắc tố của chủng *M. purpureus* MD phù hợp hơn đối với các sản phẩm rượu, trong khi đó chủng *M. purpureus* 3403 sẽ có giá trị đối với các sản phẩm thịt.

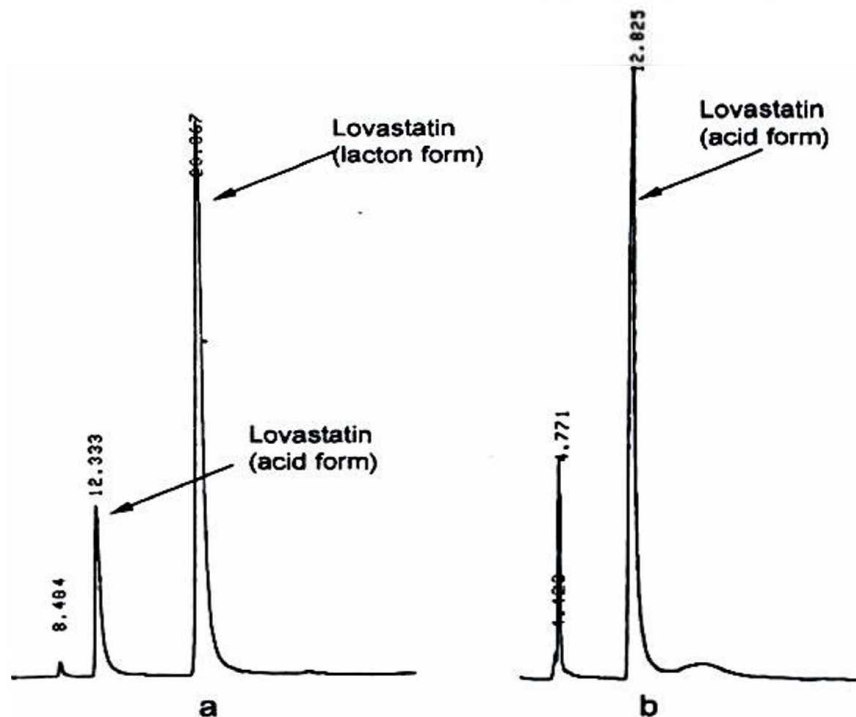


Hình 2. Sắc ký bản mỏng sắc tố của chủng *M. purpureus* MD và *M. purpureus* 3403.

Đánh giá khả năng sinh Lovastatin

Lovastatin là một dược phẩm thuộc nhóm statin và còn được gọi là mevinolin. Tuy nhiên tên gọi đầu (lovastatin) vẫn được sử dụng phổ

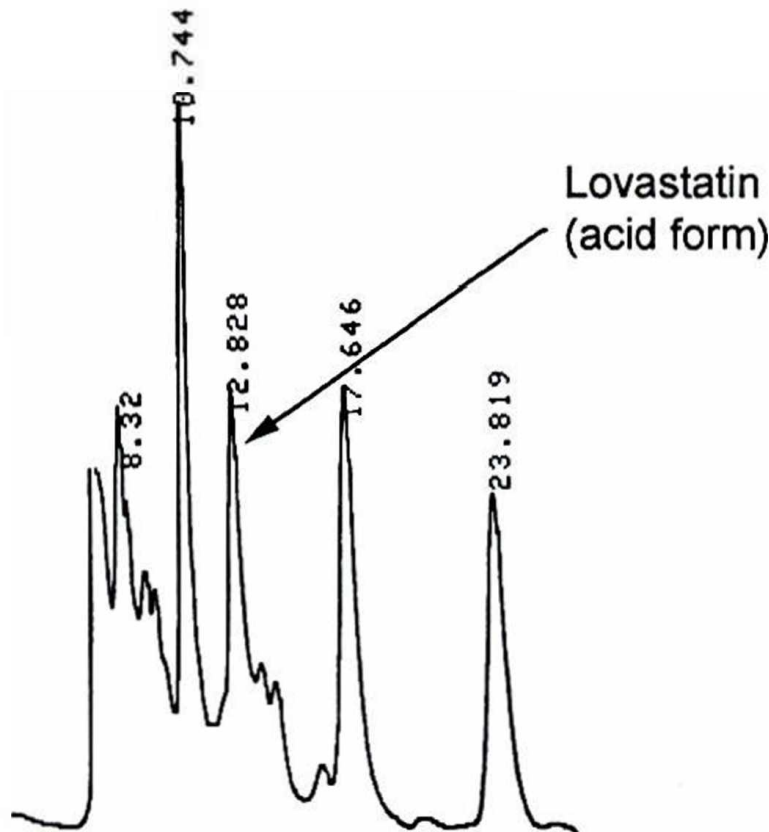
biến hơn. Theo nhiều tài liệu nghiên cứu lovastatin được tạo ra bởi *Monascus* dưới cả hai dạng axit và lacton, chúng có khả năng chuyển hóa từ dạng này sang dạng khác. Trong tự nhiên, tỉ lệ tạo thành giữa hai dạng tùy thuộc vào chủng vi sinh vật giống và các điều kiện nuôi cấy, nhưng lovastatin chủ yếu tồn tại ở dạng axit. Việc chuyển hóa giữa hai dạng với nhau phụ thuộc phần lớn vào điều kiện môi trường nuôi cấy. Mẫu chất chuẩn lovastatin hòa tan trong acetonitrile có chứa cả dạng lactone và dạng axit. Trong điều kiện phân tích của chúng tôi, trên sắc ký đồ lovastatin dạng axit xuất hiện ở phút 12,8 và dạng lactone ở phút 22,1 (Hình 3). Sự có mặt của cả hai dạng gây khó khăn cho việc đánh giá định lượng và do vậy chúng tôi quyết định chuyển hóa chúng thành dạng duy nhất là axit. Sau khi xử lý bằng dung dịch NaOH 0,1M:acetonitril tỉ lệ 6:4, toàn bộ lovastatin dạng lactone được chuyển hóa thành dạng axit. Lúc này trên sắc ký đồ chỉ xuất hiện một peak duy nhất ở phút 12,8.



Hình 3. Kết quả phân tích HPLC chuyển hóa của Lovastatin. Chất chuẩn Lovastatin 0,01% qua xử lý bằng NaOH 0,1M: ACN (6:4). a) Chất chuẩn Lovastatin dạng lacton và axit trước khi được xử lý bằng NaOH; b) Chất chuẩn Lovastatin dạng axit sau khi được xử lý bằng NaOH.

Việc phân tích lovastatin được tiến hành trên hai chủng *Monascus purpureus* MD và chủng *Monascus purpureus* 3403. Mỗi chủng được nuôi cấy với điều kiện khác nhau nhằm khảo sát ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy lên khả năng sinh tổng hợp lovastatin. Kết quả tách chiết và phân tích lovastatin đối với 2 chủng *Monascus* cho thấy không có chủng nào tạo lovastatin dạng lactone trong điều kiện nuôi cấy trên môi trường gạo hấp. Chủng *M. purpureus* MD chỉ tạo lovastatin dạng axit và ở

hàm lượng vết và không thể định lượng chính xác được. Kết quả phân tích HPLC đối với chủng *M. purpureus* 3403, lovastatin tạo ra cũng ở dạng axit và hàm lượng lovastatin trong mẫu sản phẩm đông khô cùng giá thể đạt ở mức 60 $\mu\text{g/g}$ (Hình 4). So với các chế phẩm *Monascus* trên thị trường với nồng độ lovastatin trong khoảng 90-10000 $\mu\text{g/g}$ thì đây là nồng độ không cao và do vậy để tạo các chế phẩm tương tự, việc chiết tách và làm giàu lovastatin là cần thiết.

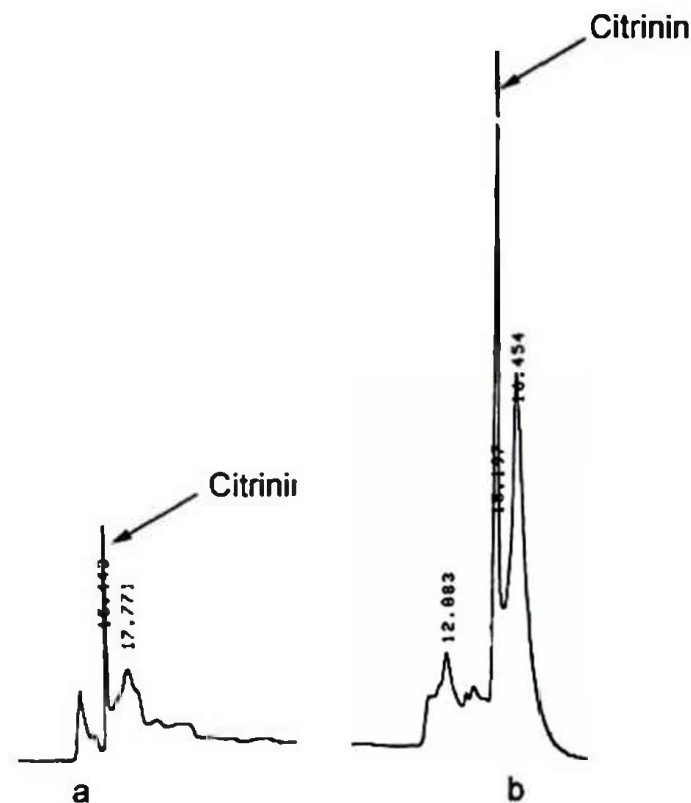


Hình 4. Kết quả phân tích HPLC phát hiện lovastatin mẫu tách chiết từ chủng *M. purpureus* 3403.

Đánh giá khả năng sinh citrinin

Việc phân tích citrinin được tiến hành cho cả 2 chủng khảo sát và quả phân tích bằng HPLC cho thấy cả hai chủng *Monascus* của Viện Công nghiệp Thực phẩm đều sinh citrinin trên môi trường gạo hấp (Hình 5). Nồng độ citrinin cao nhất là 105 $\mu\text{g/g}$. Mặc dù mức độ tổng hợp citrinin này không phải quá cao so với hàm lượng đã công bố đối với các sản phẩm

thương mại, sự có mặt của citrinin là điều đáng quan tâm và việc đưa ra các giải pháp nhằm khống chế sinh tổng hợp citrinin là điều cần thiết. Điều đặc biệt là trong khảo cứu của chúng tôi, citrinin không phát hiện được khi các chủng được nuôi cấy trên môi trường malt-glucose agar. Điều này cho thấy việc tối ưu hóa điều kiện nhằm giảm thiểu citrinin là khả thi.



Hình 5. Kết quả phân tích HPLC phát hiện citrinin. a) Mẫu tách chiết từ chủng *M. purpureus* MD; b) Mẫu tách chiết từ chủng *M. purpureus* 3403.

4. Kết luận

Hai chủng nấm *M. purpureus* MD và *M. purpureus* 3403 có những khác biệt khá rõ rệt về dạng và cường độ sắc tố tạo ra. Chủng *M. purpureus* 3403 có khả năng sinh tổng hợp lovastatin, một dược chất quan trọng trong điều trị bệnh tim mạch. Mặc dù không sản sinh ở mức độ cao, sự có mặt của citrinin ở cả hai chủng giống cũng là điều đáng quan tâm khi ứng dụng chúng trong sản xuất phẩm màu hoặc thực phẩm chức năng.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này nhận được sự tài trợ của Bộ Khoa học và Công nghệ, Bộ Công nghiệp thông qua đề tài "Bảo tồn và khai thác nguồn gen vi sinh vật công nghiệp thực phẩm". Tác giả xin cảm ơn ThS. Đinh Mỹ Hằng, ThS. Lê Thùy Mai, CN. Đào Anh Hải

(Viện Công nghiệp Thực phẩm) vì những đóng góp trong quá trình thực hiện.

Tài liệu tham khảo

- [1] J. Wang, Z. Lu, J. Chi, Multicenter clinical trial of the serum lipid-lowering effects of a *Monascus purpureus* (Red Yeast) rice preparation from traditional Chinese medicine. *Current Therapeutic Research* 58 (1997) 964.
- [2] D. Heber, I. Yip, J.M. Ashley, D.A. Elashoff, R.M. Elashoff, V.L. Go, Cholesterol-lowering effects of a proprietary Chinese red yeast rice dietary supplement, *Am. J. Clin. Nutr.* 69 (1999) 231.
- [3] C. Li, Y. Zhu, Y. Wang, *Monascus purpureus*-fermented rice (red yeast rice): a natural food

product that lowers blood cholesterol in animal models of hypercholesterolemia, *Nutr. Res.* 18 (1998) 71.

- [4] J. Wang, C. Lee, T. Pan, Improvement of monacolin K, aminobutyric acid and citrinin production ratio as a function of environment

condition of *Monascus purpureus* NTU 601, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 30 (2003) 669.

- [5] H.C. Wong, P.E. Koehler, Production and isolation of an antibiotic from *Monascus purpureus* and its relationship to pigment production, *J Food Sci.* 46 (1981) 589.

Production of pigments, Lovastatin and mycotoxin Citrinin by two *Monascus purpureus* strains

Le Duc Manh

Food Industries Research Institute, 301 Nguyen Trai, Thanh Xuan, Hanoi, Vietnam

Monascus purpureus has been used in China, Korea, and Japan as food colorant and traditional medicine for centuries. Recently it was discovered that *Monascus* produced lovastatin, an important drug for preventing cardiovascular diseases. This study was focused on technological characterization of two *Monascus* strains at the Culture Collection of Food Industries Research Institute. It was shown that the two strains differed significantly in pigment production and pigment composition. It was confirmed that *M. purpureus* 3403 capable of producing lovastatin, a cholesterol lowering agent. It was noted that although citrinin presented at low concentrations, measures should be taken before commercial realization of the strains.