

XÁC ĐỊNH ĐIỀU KIỆN NUÔI CẤY THÍCH HỢP CHO KHẢ NĂNG SINH SẮC TỐ VÀ MONACOLIN K TỪ CHỦNG NẤM MỐC *Monascus purpureus* NBRC 4485

Nguyễn Ngọc Thanh, Phạm Thị Minh Thư,
Luu Minh Châu, Bùi Hoàng Đăng Long, Huỳnh Xuân Phong*

Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

*Tác giả liên hệ: hxphong@ctu.edu.vn

Ngày nhận bài: 24.09.2021

Ngày chấp nhận đăng: 21.01.2022

TÓM TẮT

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm xác định các điều kiện nuôi cấy thích hợp cho khả năng sinh sắc tố và monacolin K từ chủng nấm mốc *Monascus purpureus* NBRC 4485. Khả năng phát triển cũng như sinh sắc tố và monacolin K của chủng *M. purpureus* NBRC 4485 được đánh giá trên các loại cơ chất khác nhau bao gồm gạo huyết rồng, gạo tím than, gạo lứt trắng, gạo trắng, gạo trắng Nhật, bắp và đậu nành. Điều kiện sinh sắc tố và monacolin K của chủng *M. purpureus* NBRC 4485 được đánh giá thông qua việc xác định các nhân tố trong quá trình lên men bán rắn bao gồm độ ẩm môi trường (30, 40, 50, 60, 70% w/v), mật độ giống chủng (10^4 , 10^5 , 10^6 bào tử/g) và thời gian nuôi cấy (8 đến 24 ngày). Kết quả cho thấy gạo lứt trắng là cơ chất thích hợp nhất trong các nguồn cơ chất thử nghiệm với hàm lượng sắc tố vàng, sắc tố đỏ và monacolin K cao nhất đạt được lần lượt là 3.057,8 AU/g, 1.781,0 AU/g và 1.329,3 μ g/g. Các điều kiện thích hợp để nuôi cấy nấm *M. purpureus* NBRC 4485 trên môi trường gạo lứt trắng được xác định với độ ẩm môi trường ban đầu là 40% w/w, mật số giống chủng 10^6 bào tử/g cơ chất khô và nuôi cấy trong 22 ngày. Hàm lượng sắc tố vàng, sắc tố đỏ và monacolin K đạt được tương ứng ở mức 6.750,2 AU/g, 4.960,9 AU/g và 2.089,3 μ g/g.

Từ khóa: Lên men bán rắn, Monacolin K, *Monascus purpureus*, sắc tố đỏ, sắc tố vàng.

Study on the Culture Conditions for Production of Pigments and Monacolin K from *Monascus purpureus* NBRC 4485

ABSTRACT

This study aimed to determine the suitable culture conditions for the production of pigments and monacolin K from mold *Monascus purpureus* NBRC 4485. The growth and production of pigments and monacolin K of *M. purpureus* NBRC 4485 were tested in various substrates including red rice, purple rice, wholegrain white rice, white rice, Japanese rice, corn, and soybean. The appropriate conditions of solid-state fermentation for pigments and monacolin K production from *M. purpureus* NBRC 4485 were investigated through determination of the following solid-state fermentation factors: initial moisture content of cultural medium (30, 40, 50, 60, 70% w/v), the density of inoculum mold (10^4 , 10^5 , 10^6 spores/g), and incubation time (8 to 24 days). The results show that the wholegrain white rice was considered as the most appropriate substrate among tested substrates. The highest contents of yellow pigment, red pigment, and monacolin K were obtained at 3,057.8 AU/g, 1,781.0 AU/g, and 1,329.3 μ g/g, respectively. The most suitable conditions to produce pigments and monacolin K from *M. purpureus* NBRC 4485 on wholegrain white rice were the moisture content of 40% w/w, mold density of 10^6 spores/g, and incubation time of 22 days. The contents of yellow pigment, red pigment, and monacolin K were 6.750,2 AU/g, 4.960,9 AU/g, and 2.089,3 μ g/g, respectively.

Keywords: Monacolin K, *Monascus purpureus*, solid-state fermentation, red pigment, yellow pigment.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Màu sắc và hương vị là những tín hiệu được cảm nhận bằng các giác quan và cũng là một

trong những chỉ tiêu để đánh giá một loại thực phẩm nào đó có hấp dẫn hay không. Do đó, để đáp ứng nhu cầu của thị trường, chất tạo màu nhân tạo đã được sử dụng ngày càng nhiều. Tuy

nhiên, mối quan tâm lớn là các chất tạo màu tổng hợp từ hóa học gây hại cho sức khỏe của con người và môi trường như gây ung thư, quái thai và khó phân hủy (Padhi, 2012; Arora, 2014). Để giải quyết tình trạng này, chất tạo màu tự nhiên là giải pháp tối ưu thay cho các chất tổng hợp nhân tạo. Việc sản xuất các sắc tố tự nhiên có thể được thực hiện bằng cách chiết xuất từ các loài thực vật (ví dụ như carotenoid, anthocyanin và chlorophyll) hoặc tổng hợp bằng cách lên men thông qua việc nuôi trồng nấm mốc, nấm men và tảo (ví dụ như phycocyanin, xanthophyll) (Chattopadhyay & cs., 2008; Mapari & cs., 2010). Việc sử dụng các vi sinh vật để sản xuất sắc tố dễ dàng hơn so với sản xuất sắc tố từ thực vật. Trong đó, nấm đã được chứng minh là một một trong những nguồn sắc tố tự nhiên thay thế tốt nhất (Gmoser & cs., 2017). Nấm có những lợi thế vượt trội so với thực vật như không phụ thuộc vào mùa, phát triển dễ dàng và nhanh chóng trong môi trường nuôi cấy rẻ tiền, sản xuất các sắc tố với các màu khác nhau và các sắc tố có tính ổn định, hòa tan và dễ dàng xử lý (Joshi & cs., 2003; Manikprabhu & Lingappa, 2013).

Từ lâu, nấm mốc *Monascus* đã được sử dụng phổ biến ở Trung Quốc, Nhật Bản và các nước Đông Nam Á, trong đó gạo mốc đỏ được lên men nhờ nấm *Monascus* được ghi nhận là thực phẩm truyền thống có màu tự nhiên lâu đời nhất (Dufosse & cs., 2014). Ở các nước, gạo mốc đỏ được sản xuất bởi nhiều loài khác nhau như *M. purpureus*, *M. ruber*, *M. anka* và *M. pilosus*. Tuy nhiên, theo y học cổ truyền Trung Quốc, *M. purpureus* là loại nấm được liệu duy nhất được chấp nhận cho quá trình lên men gạo mốc đỏ (Dược điển Trung Quốc, 2015). Trong quá trình lên men, các loài *Monascus* tạo ra nhiều chất chuyển hóa thứ cấp như sắc tố và monacolin. Sáu loại sắc tố polyketide tạo ra từ nấm *Monascus* có màu từ vàng tươi đến đỏ đậm nên được ứng dụng rộng rãi như làm chất tạo màu thực phẩm tự nhiên, chất bảo quản, thực phẩm bổ sung và trong y học cổ truyền (Srianta & Harijono, 2015). Các sắc tố này có nhiều hoạt tính sinh học khác nhau như chống ung thư, kháng khuẩn, chống lại các bệnh tiểu đường và

béo phì (Hajjaj & cs., 2012; Srianta & Harijono, 2015). Ngoài ra, trong số các monacolin được tạo ra bởi nấm mốc, monacolin K có hoạt tính ức chế mạnh với 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG CoA), một loại enzyme quan trọng của quá trình tổng hợp cholesterol trong cơ thể người, nên monacolin K được tổng hợp để dùng làm thuốc điều trị tăng cholesterol trong máu (Lee, 2012). Tuy nhiên, citrinin - một độc tố không mong muốn có khả năng gây tổn hại thận được tìm thấy trong gạo mốc đỏ. Chính điều này gây ra những tranh cãi về tính an toàn của gạo men đỏ. Tại Hoa Kỳ, chất màu từ *Monascus* chưa được Cục Quản lý Thực phẩm và Dược phẩm chấp thuận để sử dụng làm màu thực phẩm, nhưng ở châu Á lại được công nhận chung là an toàn (Lee, 1995). Mặc dù vậy, citrinin được sinh ra với hàm lượng rất khác nhau tùy thuộc vào loài *Monascus* cũng như môi trường và điều kiện nuôi cấy khác nhau (Zhang & cs., 2013; Xiong & cs., 2014). Bên cạnh đó, các nghiên cứu về citrinin cho thấy citrinin có thể dễ dàng bị phá hủy bởi nhiều tác nhân khác nhau, bao gồm nhiệt khô, nhiệt ẩm (Trivedi & cs., 1993; Hirota & cs., 2002), hydrogen peroxide (Fouler & cs., 1994) và các quá trình chuyển hóa sinh học khác nhau (Clark & cs., 2006; Li & cs., 2020).

Với mục tiêu bước đầu nghiên cứu và ứng dụng chất màu tự nhiên trong chế biến thực phẩm, đặc biệt là định hướng ứng dụng trong các sản phẩm lên men có trải qua các công đoạn gia nhiệt để giảm hàm lượng cũng như độc tính của citrinin. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm khảo sát các điều kiện thích hợp cho quá trình lên men bề mặt để sinh tổng hợp sắc tố và monacolin K từ *M. purpureus* NBRC 4485.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên vật liệu và hóa chất

Gạo tím than, gạo lứt trắng, gạo huyết rồng, gạo trắng Nhật, gạo trắng, bắp và đậu nành được mua tại chợ Hưng Lợi, Ninh Kiều, Thành phố Cần Thơ. Chủng nấm *M. purpureus*

Xác định điều kiện nuôi cấy thích hợp cho khả năng sinh sắc tố và monacolin K từ chủng nấm mốc *Monascus purpureus* NBRC 4485

NBRC 4485 từ Trung tâm Tài nguyên Sinh học Quốc gia (Biological Resource Center, NBRC) của Nhật Bản, là chủng nấm được nghiên cứu và xác định thuộc nhóm sinh citrinin rất thấp đồng thời có khả năng sinh lovastatin (Tsukahara & cs., 2009). Môi trường nuôi cấy nấm mốc được sử dụng là Malt Extract Agar (MEA; HiMedia, Ấn Độ). Các hóa chất bao gồm $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaOH, H_2SO_4 , CH_3COOH , $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (Xilong, Trung Quốc) và chất chuẩn Monacolin K (AstraZeneca, Anh).

2.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của cơ chất đến khả năng sinh tổng hợp sắc tố và monacolin K

Mục đích của thí nghiệm nhằm xác định loại cơ chất thích hợp cho quá trình sinh tổng hợp sắc tố và monacolin K. Nấm mốc *M. purpureus* NBRC 4485 được nuôi cấy trong ống thạch nghiêng ở 30°C trong 17 ngày. Thu dịch trích bào tử bằng cách cho 5ml nước cất vô trùng vào ống thạch nghiêng, sau đó tiến hành đếm bào tử nấm mốc bằng phương pháp đếm trực tiếp trên buồng đếm hồng cầu Bürk-Türk (Cadena-Herrera & cs., 2015). Cơ chất (gạo tím than, gạo lứt trắng, gạo huyết rồng, gạo trắng Nhật, gạo trắng, bắp, đậu nành) được chứa trong túi polypropylen (PP) và trộn với nước cất theo tỉ lệ 10:6. Sau đó, mẫu được thanh trùng nhiệt ướn ở 121°C trong 30 phút để cơ chất chín đều. Mẫu được để nguội đến 38-40°C rồi bổ sung $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,5M (0,00594 g/g cơ chất khô) và H_2SO_4 0,5M (0,02 ml/g cơ chất khô). Chủng dịch trích bào tử vào cơ chất sao cho đạt mật số 10^6 bào tử/g cơ chất khô. Mẫu được trộn đều và ủ ở 30°C trong 14 ngày. Thí nghiệm được thực hiện lặp lại 3 lần. Hàm lượng sắc tố được xác định theo phương pháp của Babitha & cs. (2007): sấy khô gạo lên men ở 50°C trong 24 giờ, cân 0,5g bột đã nghiền mịn cho vào 10ml ethanol 70%, lắc 120 vòng/phút trong 2 giờ ở nhiệt độ phòng, ly tâm 5.000 vòng trong 10 phút. Hút dịch phía trên và pha loãng với ethanol 70%, đo độ hấp thụ ở bước sóng 505nm đối với sắc tố đỏ và 410nm đối với sắc tố vàng. Mẫu đối chứng là ethanol 70%. Tổng số sắc tố hấp thụ $(\text{AU/g}) = \text{Abs} \times (10/0,5) \times \text{df}$.

Trong đó: Abs: độ hấp thụ mẫu; df: hệ số pha loãng. Tương tự, hàm lượng monacolin K được xác định theo phương pháp của Sun & cs. (2011), dịch sau ly tâm được pha loãng với ethanol 70% và đo độ hấp thụ ở bước sóng 238nm. Tổng lượng monacolin K tạo thành $(\mu\text{g/g}) = C \times (10/0,5) \times \text{df}$. Trong đó: C: nồng độ monacolin K có trong mẫu đo (suy ra từ phương trình tuyến tính), df: hệ số pha loãng.

2.3. Nghiên cứu ảnh hưởng của độ ẩm đến khả năng sinh tổng hợp sắc tố và monacolin K

Mục đích của thí nghiệm nhằm xác định ẩm độ thích hợp cho quá trình sinh tổng hợp sắc tố và monacolin K. Dịch trích bào tử nấm mốc *M. purpureus* NBRC 4485 được chuẩn bị như nội dung 2.2. Túi PP chứa cơ chất thích hợp được chọn từ nội dung 2.2 được trộn với nước cất để đạt độ ẩm là 30, 40, 50, 60 và 70% w/w. Độ ẩm được xác định bằng phương pháp sấy đến khối lượng không đổi ở 105°C (Lê Thanh Mai & cs., 2008). Sau đó, túi PP được đem thanh trùng nhiệt ướn ở 121°C trong 30 phút để cơ chất chín đều. Mẫu được để nguội đến 38-40°C, bổ sung $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,5M (0,00594 g/g cơ chất khô) và H_2SO_4 0,5M (0,02 ml/g cơ chất khô). Chủng dịch trích bào tử vào cơ chất sao cho đạt mật số 10^6 bào tử/g cơ chất khô. Mẫu được trộn đều và ủ ở 30°C trong 14 ngày. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần và hàm lượng sắc tố và monacolin K được xác định như mô tả ở nội dung 2.2.

2.4. Nghiên cứu ảnh hưởng của mật số nấm mốc đến khả năng sinh sắc tố và monacolin K

Mục đích của thí nghiệm nhằm xác định mật số thích hợp cho quá trình sinh tổng hợp sắc tố và monacolin K. Nấm mốc *M. purpureus* NBRC 4485 và dịch trích bào tử được chuẩn bị sau khi chọn được cơ chất và độ ẩm thích hợp cho quá trình lên men, tiến hành lên men như nội dung 2.2. Dịch trích bào tử nấm mốc được chủng vào cơ chất sao cho đạt mật số 10⁴, 10⁵ và 10⁶ bào tử/g cơ chất khô. Hàm lượng sắc tố và monacolin K được xác định ở ngày thứ 14 với mỗi nghiệm thức được thực hiện 3 lần lặp lại.

2.5. Nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến khả năng sinh sắc tố và monacolin K

Mục đích của thí nghiệm nhằm xác định thời gian nuôi cấy thích hợp cho quá trình sinh tổng hợp sắc tố và monacolin K. Nấm mốc *M. purpureus* NBRC 4485 được nuôi cấy trên cơ chất có độ ẩm với mật số thích hợp được lựa chọn ở các thí nghiệm trước. Hàm lượng sắc tố và monacolin K được phân tích sau 8, 10, 12, 14, 17, 22 và 24 ngày nuôi cấy. Thí nghiệm được thực hiện lặp lại 3 lần.

2.6. Phân tích và xử lý kết quả

Kết quả được xử lý và vẽ biểu đồ bằng phần mềm Microsoft Excel 2013 (Microsoft Corporation, Hoa Kỳ). Số liệu được xử lý thống kê theo kiểm định Duncan bằng phần mềm Statgraphics Centurion XVI (Statpoint Technologies Inc., Hoa Kỳ).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của các loại cơ chất đến khả năng sinh sắc tố và monacolin K

Nghiên cứu này được thực hiện với nhiều loại cơ chất khác nhau như gạo lứt trắng, gạo huyết rồng, gạo tím than, gạo trắng Nhật, gạo trắng, bắp và đậu nành. Hàm lượng sắc tố và monacolin K được xác định vào ngày thứ 14 của

quá trình nuôi cấy được trình bày trong bảng 1. Kết quả ở bảng 1 cho thấy nấm mốc *M. purpureus* NBRC 4485 có khả năng lên men ở tất cả các cơ chất khảo sát. Các nguồn cơ chất khác nhau dẫn đến việc hình thành sắc tố và monacolin K khác nhau. Cụ thể là lượng sắc tố vàng và đỏ tạo ra cao nhất ở mẫu gạo lứt trắng và khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê so với các loại cơ chất khác. Ở cơ chất gạo lứt trắng, tổng sắc tố vàng đạt 3.057,8 AU/g và tổng sắc tố đỏ đạt 1.781,0 AU/g. Ngoài gạo lứt trắng, bắp hình thành lượng sắc tố cao thứ hai với 1.496,0 AU/g sắc tố vàng và 1.117,3 AU/g sắc tố đỏ. Các nguồn cơ chất còn lại có hàm lượng sắc tố vàng nằm trong khoảng 292,4 - 57,8 AU/g và hàm lượng sắc tố đỏ nằm trong khoảng 194,7-399,1 AU/g. Trong đó, nấm mốc phát triển trên cơ chất đậu nành cho lượng sắc tố thấp nhất. Điều này được giải thích rằng, gạo lứt có chứa hàm lượng các chất dinh dưỡng như protein, lipid, khoáng chất và vitamin lớn hơn so với gạo đã qua chà xát nên nấm mốc đã sử dụng các dưỡng chất có sẵn từ nguồn cơ chất này để phát triển và hình thành sắc tố (Wang & cs., 2019). Trong khi đó, đậu nành lại cho hàm lượng sắc tố thấp nhất. Nguyên nhân có thể là do đậu nành rất giàu protein với 34%, trong khi carbohydrate chiếm thấp hơn với 24,6% và chủng *M. purpureus* NBRC 4485 không thể phân hủy một số oligosaccharide và polysaccharide có trong đậu nành do thiếu gen tổng hợp các enzyme phân giải (Yang & cs., 2015).

Bảng 1. Ảnh hưởng của các loại cơ chất đến sự hình thành sắc tố và monacolin K của *M. purpureus* NBRC 4485

Loại cơ chất	Lượng sắc tố vàng (AU/g)	Lượng sắc tố đỏ (AU/g)	Lượng monacolin K (µg/g)
Gạo tím than	415,1 ^{de}	351,1 ^c	658,5 ^d
Gạo huyết rồng	421,3 ^{de}	219,6 ^d	442,2 ^f
Gạo lứt trắng	3.057,8 ^a	1.781,0 ^a	1.329,3 ^a
Gạo trắng	857,8 ^c	399,1 ^c	497,9 ^e
Gạo trắng Nhật	550,2 ^d	203,6 ^d	354,8 ^g
Bắp	1.496,0 ^b	1.117,3 ^b	1.089,5 ^b
Đậu nành	292,4 ^f	194,7 ^d	716,1 ^c

Ghi chú: Giá trị trong bảng là giá trị trung bình của 3 lần thí nghiệm lặp lại. Các giá trị trung bình trong cùng một cột theo sau có các chữ cái giống nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ở độ tin cậy 95%.

Tương tự, khi lên men ở cơ chất gạo lứt trắng thì hàm lượng monacolin K sinh ra đạt cao nhất với 1.329,3 $\mu\text{g/g}$. Kế đến là bắp, đậu nành, gạo tím than, gạo trắng, gạo huyết rồng, gạo trắng Nhật có hàm lượng monacolin K giảm dần, lần lượt là 1.089,5; 716,1; 658,5; 497,9; 442,2 và 354,8 $\mu\text{g/g}$. Trong giai đoạn đầu tiên của quá trình lên men, nấm sử dụng nguồn carbon và nitrogen từ cơ chất để thực hiện quá trình chuyển hóa chính. Vào cuối giai đoạn logarit, *M. purpureus* NBRC 4485 thay đổi quá trình chuyển hóa dẫn đến sự tổng hợp các sắc tố cùng các hợp chất khác như monacolin K, thông qua việc điều chỉnh con đường sinh tổng hợp acetyl-CoA (Yang & cs., 2015). Kết quả này cao hơn so với nghiên cứu của Vũ Thanh Thảo & cs. (2011), khi khảo sát cơ chất nuôi cấy thích hợp để thu sinh khối giàu monacolin K với hai loại cơ chất là gạo và củ từ với hàm lượng monacolin K đạt 973,58 $\mu\text{g/g}$ ở cơ chất gạo và ở cơ chất củ từ là 319,09 $\mu\text{g/g}$. Ngoài ra, kết quả này cũng cho kết quả cao hơn trong nghiên cứu của Srianta & Harijono (2015), hàm lượng monacolin K thu được chỉ nằm trong khoảng 1.000-1.230 $\mu\text{g/g}$ khi lên men trên hạt cao lương. Những khác biệt về số lượng sắc tố và monacolin K có thể liên quan đến phản ứng phức tạp với các nguồn carbon khác nhau. Nhìn chung, từ kết quả trên, gạo lứt trắng được chọn để làm nguồn cơ chất cho thí nghiệm tiếp theo.

3.2. Ảnh hưởng của độ ẩm đến khả năng sinh tổng hợp sắc tố và monacolin K

Đối với quá trình lên men ở trạng thái rắn, độ ẩm là một thông số quan trọng để kiểm soát sự phát triển của vi sinh vật và sản xuất chất chuyển hóa (Khanahmadi & cs., 2006). Bảng 2 thể hiện ảnh hưởng độ ẩm ban đầu của chất nền đến quá trình sinh tổng hợp sắc tố và monacolin K.

Kết quả ở bảng 2 cho thấy lượng sắc tố vàng và đỏ cao nhất được tổng hợp ở độ ẩm 40% với lượng sắc tố vàng là 3.038,2 AU/g và đối với sắc tố đỏ là 2.112,6 AU/g. Ở độ ẩm 50% lượng sắc tố được tạo ra cao thứ hai, kế đến là ở 60%. Ở độ ẩm 70% có hàm lượng sắc tố thấp nhất với lượng sắc tố vàng chỉ đạt 203,6 AU/g và lượng sắc tố đỏ là 105,8 AU/g. Ở độ ẩm 30%, nấm mốc chỉ

phát triển rất ít trên cơ chất gạo lứt trắng với lớp khuẩn ty trắng và mỏng, gần như không xuất hiện sắc tố đỏ, cho thấy độ ẩm này không phù hợp cho nấm phát triển và sinh sắc tố. Kết quả này có sự tương đồng với kết quả nghiên cứu của của Yongsmith & cs. (2000), khi lên men gạo với các chủng nấm mốc đột biến thì hàm lượng sắc tố đạt tối đa khi độ ẩm ban đầu là 38%. Nghiên cứu của Lee & cs. (2002) cũng cho thấy hàm lượng sắc tố đỏ giảm đi rất nhiều khi nuôi cấy trong môi trường có độ ẩm 35% so với độ ẩm 40%. Tuy nhiên, theo nghiên cứu của Babitha & cs. (2007) thì lượng sắc tố tối đa được quan sát ở 50% độ ẩm ban đầu khi sản xuất chất màu từ bột hạt mít. Sự giảm khả năng tạo sắc tố được quan sát thấy khi độ ẩm cao hơn hoặc thấp hơn mức tối ưu và nghiên cứu của Johns & Stuart (1991) cho thấy rằng độ ẩm chất nền ban đầu dưới 40% hình thành sắc tố ít hơn là ở độ ẩm 50-56%. Nguyên nhân là do các nghiên cứu sử dụng các chủng nấm *Monascus* cũng như các loại chất nền khác nhau và mỗi chủng *Monascus* lại có độ ẩm ban đầu tối ưu riêng cho việc sản xuất sắc tố. Khi độ ẩm ban đầu cao dẫn đến chất nền bị kết dính, lượng oxy không được cung cấp đủ cho sự phát triển của vi sinh vật.

Xét về hàm lượng monacolin K ở từng độ ẩm được khảo sát, kết quả từ bảng 2 cho thấy hàm lượng monacolin K cao nhất thu được ở độ ẩm 40% là 1.904,6 $\mu\text{g/g}$, tiếp theo là đến độ ẩm 50% với 1.104,8 $\mu\text{g/g}$ và thấp nhất ở độ ẩm 70% với 389,3 $\mu\text{g/g}$. Kết quả này khác với kết quả Vũ Thanh Thảo & cs khi xác định độ ẩm thích hợp cho khả năng tổng hợp monacolin K trên cơ chất gạo đạt cao nhất là 65% (Vũ Thanh Thảo & cs., 2011). Hàm lượng nước ban đầu của môi trường là một chỉ tiêu rất quan trọng để kiểm soát sự phát triển của vi sinh vật và quá trình tổng hợp các chất chuyển hóa. Độ ẩm quá thấp dẫn đến mức độ trương nở của chất nền thấp dẫn đến sự phát triển và sản xuất chất chuyển hóa thấp. Tuy nhiên, khi độ ẩm ban đầu tăng cao quá cao thì chất nền dễ kết tụ và gây bất lợi cho sự phát triển của nấm (Zhang & cs., 2018). Như vậy, độ ẩm thích hợp cho quá trình sinh tổng hợp sắc tố và monacolin K của chủng *M. purpureus* NBRC 4485 trong nghiên cứu được xác định là 40%.

Bảng 2. Ảnh hưởng của độ ẩm đến sự hình thành sắc tố và monacolin K của *M. purpureus* NBRC 4485

Độ ẩm (%)	Lượng sắc tố vàng (AU/g)	Lượng sắc tố đỏ (AU/g)	Lượng monacolin K ($\mu\text{g/g}$)
70	203,6 ^d	105,8 ^c	389,3 ^d
60	368,9 ^c	196,4 ^c	474,2 ^c
50	2.825,8 ^b	1.432,8 ^b	1.104,8 ^b
40	3.038,2 ^a	2.112,6 ^a	1.904,6 ^a

Ghi chú: Giá trị trong bảng là giá trị trung bình của 3 lần thí nghiệm lặp lại. Các giá trị trung bình trong cùng một cột theo sau có các mẫu tự giống nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ở độ tin cậy 95%.

Bảng 3. Ảnh hưởng của mật số nấm mốc đến sự hình thành sắc tố và monacolin K của *M. purpureus* NBRC 4485

Mật số (bào tử/g)	Lượng sắc tố vàng (AU/g)	Lượng sắc tố đỏ (AU/g)	Lượng monacolin K ($\mu\text{g/g}$)
10^4	712,0 ^c	431,1 ^c	664,2 ^c
10^5	2.928 ^b	1.758,0 ^b	1.462,6 ^b
10^6	3.769 ^a	2.039,0 ^a	1.901,6 ^a

Ghi chú: Giá trị trong bảng là giá trị trung bình của 3 lần thí nghiệm lặp lại. Các giá trị trung bình trong cùng một cột theo sau có các chữ cái giống nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ở độ tin cậy 95%.

3.3. Ảnh hưởng của mật số nấm mốc đến khả năng sinh sắc tố và monacolin K

Mật số bào tử nấm mốc để chủng giống cũng là một yếu tố quan trọng có tác động đáng kể đến sự phát triển của vi sinh vật và sản xuất các chất chuyển hóa có giá trị trong lên men bề mặt rắn. Do đặc tính của nấm mốc *Monacus*, mật số cao nhất đạt được khi nuôi cấy trên môi trường tối đa cũng chỉ đạt khoảng 10^6 - 10^7 bào tử/g cơ chất khô. Do đó, các nghiên cứu liên quan đến nấm mốc này chỉ bố trí ở mật số khoảng 10^4 - 10^6 bào tử/g cơ chất khô (Lee & cs., 2002; Ajdari & cs., 2011; Sun & cs., 2011). Thí nghiệm được thực hiện với 3 nồng độ giống khác nhau (10^4 , 10^5 và 10^6 bào tử/g) để đánh giá ảnh hưởng của mật số bào tử đến khả năng phát triển và sinh sắc tố cũng như monacolin K của *M. purpureus* NBRC 4485 sau 14 nuôi cấy. Kết quả được trình bày trong bảng 3.

Kết quả ở bảng 3 có thể thấy hàm lượng sắc tố cũng như hàm lượng monacolin K tăng lên đáng kể khi tăng mật số bào tử chủng giống ban

đầu. Cụ thể là ở mật số 10^4 bào tử/g thì hàm lượng sắc tố vàng là 712,0 AU/g, hàm lượng sắc tố đỏ là 431,1 AU/g và hàm lượng monacolin K là 664,2 $\mu\text{g/g}$. Khi bổ sung mật số ở 10^6 bào tử/g thì hàm lượng sắc tố vàng, đỏ và monacolin K tăng lên lần lượt là 3.769 AU/g, 2.039 AU/g, 1.901,6 $\mu\text{g/g}$. Như vậy, kết quả cho thấy là cần thiết phải sử dụng mật số bào tử tối đa để chủng vào cơ chất với mục tiêu thu được tối đa lượng sắc tố cũng như monacolin K. Kết quả phù hợp với nghiên cứu của Pandey & cs. (2000), kết quả cho thấy bổ sung nồng độ giống phù hợp sẽ làm tăng khả năng tổng hợp các chất chuyển hóa thứ cấp. Do đó, mật số bào tử đủ cao giúp cho nấm mốc thích nghi với môi trường và sinh trưởng tế bào ở mức tốt hơn. Từ đó làm tăng tốc độ lên men, rút ngắn thời gian sản xuất và việc tổng hợp các chất chuyển hóa thứ cấp được nhanh hơn. Tuy nhiên, việc bổ sung nồng độ giống quá nhiều có thể dẫn đến tích lũy sinh khối và tiêu hao chất dinh dưỡng một cách nhanh chóng. Điều này bất lợi cho quá trình tổng hợp các chất chuyển hóa thứ cấp sau này (Zhang & cs., 2018).

Bảng 4. Lượng sắc tố và monacolin K tạo thành theo thời gian nuôi cấy của *M. purpureus* NBRC 4485

Thời gian (ngày)	Lượng sắc tố vàng (AU/g)	Lượng sắc tố đỏ (AU/g)	Lượng monacolin K ($\mu\text{g/g}$)
8	198,2 ^h	118,2 ^g	352,9 ^g
10	330,7 ^g	203,6 ^f	444,1 ^f
12	1.489,8 ^f	284,4 ^e	521,5 ^e
14	3.560,0 ^e	1.815,1 ^d	1.714,9 ^d
17	6.212,4 ^d	3.627,6 ^c	1.931,5 ^c
20	6.515,6 ^c	4.573,3 ^b	2.020,3 ^b
22	6.750,2 ^b	4.960,9 ^a	2.089,3 ^{ab}
24	6.891,3 ^a	4.995,2 ^a	2.097,6 ^a

Ghi chú: Giá trị trong bảng là giá trị trung bình của 3 lần thí nghiệm lặp lại. Các giá trị trung bình trong cùng một cột theo sau có các chữ cái giống nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ở độ tin cậy 95%.

3.4. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến khả năng sinh sắc tố và monacolin K

Kết quả xác định ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến sự hình thành sắc tố và monacolin K được trình bày ở bảng 4. Kết quả cho thấy hàm lượng sắc tố và monacolin K tăng dần qua các ngày và tăng mạnh nhất từ ngày 12 đến ngày 20. Từ ngày 20 đến ngày 24, cả hàm lượng sắc tố và monacolin K đều chỉ tăng với lượng không đáng kể và có khuynh hướng tương đối ổn định. Trong những ngày đầu, nấm mốc bắt đầu sử dụng nguồn cơ chất để phát triển và dần dần thích nghi với môi trường. Từ ngày thứ 12 đến ngày 20, lượng sắc tố và monacolin K tăng từ 1.489,8 AU/g lên 6.515,6 AU/g đối với sắc tố vàng, từ 284,4 AU/g lên 4.573,3 AU/g đối với sắc tố đỏ và từ 521,5 $\mu\text{g/g}$ lên 2.020,3 $\mu\text{g/g}$ đối với monacolin K. Lúc này nấm mốc đã thích nghi nên phát triển rất nhanh và đồng thời tạo ra các sản phẩm chuyển hóa thứ cấp. Tuy nhiên đến ngày 22, lượng sắc tố và monacolin K không còn tăng mạnh và cơ bản ổn định sau 24 ngày, kết quả thống kê cho thấy sắc tố đỏ (4.960,9 AU/g và 4.995,2 AU/g) và monacolin K (2.089,3 $\mu\text{g/g}$ và 2.097,6 $\mu\text{g/g}$) không khác biệt ý nghĩa thống kê với độ tin cậy 95%. Điều này có thể là do lượng chất dinh dưỡng trong môi trường không còn đủ nhiều để nấm mốc sử dụng, lúc này nấm mốc đã già và hình thành bào tử. Kết quả này có

sự khác biệt với một số nghiên cứu đi trước như nghiên cứu của Zhang & cs. (2018) khi xác định khoảng thời gian phù hợp để lên men bằng nấm mốc *M. ruber* là 18 ngày. Nghiên cứu của Julio & cs. (2007), thời gian tối ưu để lên men bề mặt rắn với gạo là 7 ngày và với bã mía là 10-11 ngày. Các kết quả này đã cho thấy thời khoảng thời gian tối ưu để sản xuất sắc tố và monacolin K có thể thay đổi là do sự khác biệt về loài, chất nền và điều kiện lên men (Xu & cs., 2005; Panda & cs., 2008).

4. KẾT LUẬN

Trong phạm vi bước đầu xác định các điều kiện thích hợp để chủng nấm mốc *M. purpureus* NBRC 4485 sản xuất sắc tố và monacolin K, nghiên cứu đã xác định được một số thông số cơ bản cho quá trình nuôi cấy bao gồm cơ chất gạo lứt trắng với độ ẩm 40% v/w, nồng độ giống chủng 10^6 bào tử/g và thu hoạch vào ngày thứ 22. Hàm lượng sắc tố vàng, sắc tố đỏ và monacolin K thu được với điều kiện nuôi cấy này đạt hàm lượng lần lượt là 6.750,2 AU/g, 4.960,9 AU/g và 2.089,3 $\mu\text{g/g}$. Kết quả nghiên cứu cho thấy triển vọng ứng dụng chủng nấm mốc *M. purpureus* NBRC 4485 trong sản xuất các chất màu tự nhiên ứng dụng trong thực phẩm cũng như monacolin K ứng dụng trong dược phẩm.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn Trường Đại học Cần Thơ đã tài trợ kinh phí để nghiên cứu này được thực hiện thông qua đề tài có mã số T2020-109.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ajdari Z., Ebrahimpour A., Abdul M.M., Hamid M., Mohamad R. & Ariff A.B. (2011). Nutritional requirements for the improvement of growth and sporulation of several strains of *Monascus purpureus* on solid state cultivation. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2011: 487329.
- Babitha S.S., Soccol C.R. & Pandey A. (2007). Solid-state fermentation for the production of *Monascus* pigments from jackfruit seed. *Bioresource Technology*. 98(8): 1554-1560.
- Cadena-Herrera D., Lara E.E.J., Ramírez-Ibañez D.N., López-Morales A.C., Pérez O.N., Flores-Ortiz F.L. & Medina-Rivero E. (2015). Validation of three viable-cell counting methods: Manual, semi-automated, and automated. *Biotechnology Reports*. 7: 9-16.
- Chattopadhyay P., Chatterjee S. & Sen S.K. (2008). Biotechnological potential of natural food grade biocolorants. *African Journal of Biotechnology*. 7(17): 2972-2985.
- Chinese Pharmacopoeia (2015). Editorial Committee of Chinese Pharmacopoeia, 2015 (Beijing: China Medical Science and Technology Press). pp. 860-861.
- Clark R.B., Capon J.R., Lacey E., Tennant S. & Gillb H.J. (2006). Citrinin revisited: from monomers to dimers and beyond. *Organic and Biomolecular Chemistry*. 4(8): 1520-1528.
- Dufosse L., Fouillaud M., Caro Y., Mapari S.A. & Sutthiwong N. (2014). Filamentous fungi are large-scale producers of pigments and colorants for the food industry. *Current Opinion in Biotechnology*. 26: 56-61.
- Fouler S.G., Trivedi A.B., & Kitabatake N. (1994). Detoxification of citrinin and ochratoxin A by hydrogen peroxide. *Journal of AOAC International*. 77(3): 631-637.
- Gmoser R., Ferreira J.A., Lennartsson P.R. & Taherzadeh M.J. (2017). Filamentous ascomycetes fungi as a source of natural pigments. *Fungal Biology and Biotechnology*. 4(1): 1-25.
- Hajjaj H., François J.M., Goma G. & Blanc P.J. (2012). Effect of amino acids on red pigments and citrinin production in *Monascus ruber*. *Journal of Food Science*. 77(3): 156-159.
- Higa Y., Kim Y.S., Altaf-Ul-Amin M., Huang M., Ono N. & Kanaya S. (2020). Divergence of metabolites in three phylogenetically close *Monascus* species (*M. pilosus*, *M. ruber*, and *M. purpureus*) based on secondary metabolite biosynthetic gene clusters. *BMC Genomics*. 21(1): 679.
- Hirota M., Menta A., Yoneyama K. & Kitabatake N. (2002). A Major decomposition product, citrinin H₂, from citrinin on heating with moisture. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 66(1): 206-210.
- Johns M.R. & Stuart D.M. (1991). Production of pigments by *Monascus purpureus* in solid culture. *Journal of Industrial Microbiology*. 8(1): 23-28.
- Joshi V.K., Attri D., Bala A. & Bhushan S, (2003). Microbial pigments. *Indian Journal of Biotechnology*. 2(3): 362-369.
- Julio C.C., Bruno O.O., Adenise L.W., Asho, P., Sumathy B. & Carlos R.S. (2007). Effect of substrates on the production of *Monascus* biopigments by solid-state fermentation and pigment extraction using different solvents, *Indian Journal of Biotechnology*. 6(6): 194-199.
- Khanahmadi M., Roostaazad R., Mitchell D.A., Miranzadeh M., Bozorgmehri R. & Safekordi A. (2006). Bed moisture estimation by monitoring of air stream temperature rise in packed-bed solid-state fermentation. *Chemical Engineering Science*. 61(17): 5654-5666.
- Lê Thanh Mai, Nguyễn Thị Hiền, Phạm Thu Thủy, Nguyễn Thanh Hằng & Lê Thị Lan Chi (2008). Các phương pháp phân tích ngành công nghệ lên men. Nhà xuất bản Khoa học Kỹ thuật, Hà Nội.
- Lee B.K., Piao H.Y. & Chung W.J. (2002). Production of red pigments by *Monascus purpureus* in solid-state culture. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 7: 21-25.
- Lee D.S. (2012). Development of monacolin K-enriched ganghwayakssuk (*Artemisia princeps* Pamp.) by fermentation with *Monascus pilosus*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 22(7): 975-980.
- Lee Y.K. (1995). Natural colors from microbial sources. *Proceedings of the National Seminar on Food Technology-Food Ingredients*, Kuala Lumpur, Malaysia. pp. 189-197.
- Li P., Su R., Yin R., Lai D., Wang M., Liu Y. & Zhou L. (2020). Detoxification of mycotoxins through biotransformation. *Toxins*. 12(2): 121.
- Manikprabhu D. & Lingappa K. (2013). γ Actinorhodin a natural and attorney source for the synthetic dye to detect acid production of fungi. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 20(2): 163-168.
- Mapari S.A., Thrane U. & Meyer A.S. (2010). Fungal polyketide azaphilone pigments as future natural

- food colorants. Trends in Biotechnology. 28(6): 300-307.
- Padhi B.S. (2012). Pollution due to synthetic dyes toxicity and carcinogenicity studies and remediation. International Journal of Environmental Sciences. 3(3): 940-955.
- Panda B.P., Javed S. & Ali M. (2008). Optimization of fermentation parameters for higher lovastatin production in red mold rice through co-culture of *Monascus purpureus* and *Monascus ruber*. Food and Bioprocess Technology. 3(3): 373-378.
- Pandey A., Soccol C.R. & Mitchell D. (2000). New developments in solidstate fermentation: I-Bioprocess and products. Process Biochemistry. 35(10): 1153-1169.
- Srianta I. & Harijono (2015). *Monascus* - fermented sorghum: pigments and monacolin K produced by *Monascus purpureus* on whole grain, dehulled grain and bran substrates. International Food Research Journal. 22(1): 377-382.
- Sun J.L., Zou X., Liu A.Y. & Xiao T.F. (2011). Elevated yield of Monacolin K in *Monascus purpureus* by fungal elicitor and mutagenesis of UV and LiCl. Biological Research. 44(4): 377-382.
- Trivedi A.B., Hirota M., Doi E. & Kitabatake N. (1993). Formation of a new toxic compound, citrinin H1, from citrinin on mild heating in water. Journal of the Chemical Society, Perkin Transaction 1. 18: 2167-2171.
- Vũ Thanh Thảo, Huỳnh Bái Nhi, Cao Thị Hồng Gấm & Trần Cát Đông (2011). Khảo sát điều kiện nuôi cấy vi nấm *Monascus purpureus* để thu sinh khối giàu Monacolin. Tạp chí Y học thành phố Hồ Chí Minh. 5(1): 195-202.
- Wang A.S.M.C.P., Wang N., Yang L. & Xiao Z. (2019). Brown rice versus white rice: nutritional quality, potential health benefits, development of food products, and preservation technologies. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 18: 1070-1096.
- Xiong X., Zhang X., Wu Z., & Wang Z. (2014). Optimal selection of agricultural products to inhibit citrinin production during submerged culture of *Monascus anka*. Biotechnology and Bioprocess Engineering. 19(6): 1005-1013.
- Xu B.J., Wang Q.J., Jia X.Q. & Sung C.K. (2005). Enhanced lovastatin production by solid state fermentation of *Monascus ruber*. Biotechnology and Bioprocess Engineering. 10(1): 78-84.
- Yang Y., Liu B., Du X., Li P., Liang B., Cheng X., Du L.C., Huang D., Wang L. & Wang S. (2015). Complete genome sequence and transcriptomics analyses reveal pigment biosynthesis and regulatory mechanisms in an industrial strain, *Monascus purpureus* YY1. Scientific Reports. 5(1): 8331-8339.
- Yongsmith B., Kitprechavanich V., Chitradon L., Chairisook C. & Budda N. (2000). Color mutants of *Monascus* sp. KB9 and their comparative glucoamylases on rice solid culture. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 10(1-3): 263-272.
- Zhang B.B., Xing H.B., Jiang B.J., Chen L., Xu G.R., Jiang Y. & Zhang D.Y. (2018). Using millet as substrate for efficient production of monacolin K by solid-state fermentation of *Monascus ruber*. Journal of Bioscience and Bioengineering. 125(3): 333-338.
- Zhang L., Li Z., Dai B., Zhang W. & Yuan Y. (2013). Effect of submerged and solid-state fermentation on pigment and citrinin production by *Monascus purpureus*. Acta Biologica Hungarica. 64(3): 385-394.