

KHẢO SÁT ĐIỀU KIỆN NUÔI CẤY THÍCH HỢP CHO KHẢ NĂNG SINH SẮC TỐ VÀ MONACOLIN K TỪ *Monascus purpureus*

Nguyễn Ngọc Thanh, Phạm Thị Anh Thơ, Lưu Minh Châu,
Bùi Hoàng Đăng Long và 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

Lịch sử bài báo

Ngày nhận: 15/9/2021; Ngày nhận chỉnh sửa: 29/10/2021; Ngày duyệt đăng: 09/12/2021.

Tóm tắt

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm xác định pH ban đầu thích hợp sinh cho khả năng sinh sắc tố và monacolin K từ nấm mốc *Monascus purpureus* NBRC 4485. Ngoài ra, để cải thiện khả năng tổng hợp sắc tố và monacolin K, khảo sát ảnh hưởng khi bổ sung nguồn dinh dưỡng như carbon, nitrogen vào môi trường cơ chất gạo lứt. Hàm lượng sắc tố vàng, sắc tố đỏ và monacolin K (2.089,3 µg/g) đạt được tương ứng ở mức 6.946,71 AU/g, 6.269,33 AU/g và 2.574,45 µg/g khi nuôi cấy nấm mốc *M. purpureus* ở pH 5, môi trường được bổ sung 0,5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ và 0,8% glycerol. Sắc tố sau thu hoạch có sự suy giảm sau 1 tháng (duy trì được 85,1% và 83,51% tương ứng với sắc tố vàng và đỏ) khảo sát trong điều kiện môi trường tự nhiên.

Từ khóa: Lên men bề mặt rắn, monacolin K, *Monascus purpureus*, sắc tố đỏ, sắc tố vàng.

EVALUATING THE CULTURE CONDITIONS FOR PRODUCING PIGMENTS AND MONACOLIN K FROM *Monascus purpureus*

Nguyen Ngoc Thanh, Pham Thi Anh Tho, Luu Minh Chau,
Bui Hoang Dang Long and Huynh Xuan Phong*

Biotechnology Research and Development Institute, Can Tho University

*Corresponding author: hxphong@ctu.edu.vn

Article history

Received: 15/9/2021; Received in revised form: 29/10/2021; Accepted: 09/12/2021

Abstract

This study was conducted to determine the suitable initial pH for the production of pigments and monacolin K from the mold *Monascus purpureus* NBRC 4485. In addition, to increase the biosynthesis ability of pigments and monacolin K, the effect of adding nutrient sources such as carbon and nitrogen to the brown rice substrate was investigated. The contents of yellow pigment, red pigment, and monacolin K were achieved at 6,946.71 AU/g, 6,269.33 AU/g and 2,574.45 µg/g, respectively, from *M. purpureus* cultured at pH 5, the medium was supplemented with 0.5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and 0.8% glycerol. The pigment stability has decreased after 1 month (85.1% and 83.51% of yellow and red pigments were remained, respectively) in natural environmental conditions.

Keywords: Solid surface fermentation, monacolin K, *Monascus purpureus*, red pigment, yellow pigment.

DOI: <https://doi.org/10.52714/dthu.11.2.2022.943>

Trích dẫn: Nguyễn Ngọc Thanh, Phạm Thị Anh Thơ, Lưu Minh Châu, Bùi Hoàng Đăng Long và Huỳnh Xuân Phong. (2022). Khảo sát điều kiện nuôi cấy thích hợp cho khả năng sinh sắc tố và monacolin K từ *Monascus purpureus*. Tạp chí Khoa học Đại học Đồng Tháp, 11(2), 88-97.

1. Giới thiệu

Trong xã hội hiện đại, con người ngày càng có ý thức trong việc bảo vệ sức khỏe và nhu cầu sử dụng các sản phẩm có nguồn gốc tự nhiên cũng ngày càng tăng cao. Do đó, các nhà sản xuất bắt đầu quan tâm đến việc sử dụng chất tạo màu thực phẩm tự nhiên hơn là các loại chất tạo màu nhân tạo (Malik và cs., 2012). Trong những năm gần đây, các hoạt động sản xuất chất màu tự nhiên từ động vật, thực vật và vi sinh vật đang trở nên phổ biến hơn (Sigurdson và cs., 2017). Trong đó, vi sinh vật là một nguồn đầy hứa hẹn cho các chất tạo màu thực phẩm tự nhiên. Chất màu từ các loài vi sinh vật mang lại những lợi thế đáng kể vì chúng có thể được sản xuất với bất kỳ số lượng nào và không phụ thuộc vào sự thay đổi của tự nhiên (Tuli và cs., 2015). Hiện nay, các chất màu do vi sinh vật sản xuất và được sử dụng thương mại là riboflavin (màu vàng được chiết xuất từ *Eremothecium ashbyii* và *Ashbya gossypii*; carotenoid (sắc tố vàng được sản xuất từ vi tảo như β -caroten (từ *Dunaliella salina* và *D. bardawil*), astaxanthin (từ *Haematococcus pluvialis*) và phycocyanin (sắc tố xanh được sản xuất bởi *Spirulina*)... Trong đó, không thể không kể đến các chất màu từ *Monascus*, với 6 loại sắc tố polyketide tạo ra có màu từ vàng tươi đến đỏ đậm. Chính vì vậy, chúng 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. Không chỉ vậy, trong quá trình lên men, *Monascus* còn tạo ra nhiều chất chuyển hóa thứ cấp có hoạt tính sinh học khác nhau như chống ung thư, kháng khuẩn, chống lại các bệnh tiểu đường và béo phì (Feng và cs., 2012).

Nhìn chung, sắc tố từ vi sinh vật (vi khuẩn, nấm và vi tảo) là một trong những nguồn chất màu thực phẩm tự nhiên hứa hẹn nhất, có thể được sản xuất cả nội bào và ngoại bào. Chúng được đặc trưng bởi năng suất cao, bền vững và chi phí tương đối thấp do có thể được nuôi trên chất thải nông nghiệp và thực phẩm vào bất kỳ thời điểm. Ngoài ra, các chất màu thu được rất đa dạng, dễ chiết xuất và tương đối bền nhiệt, mang lại một số lợi ích về sức khỏe và dinh dưỡng (Malik và cs., 2012). Do đó, nghiên cứu này được thực hiện nhằm khảo sát các điều kiện thích hợp cho quá trình lên men bề mặt rắn để cải thiện khả năng sinh tổng hợp sắc tố và monacolin K từ *Monascus*.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên vật liệu và hóa chất

Chủng nấm *M. purpureus* NBRC 4485 từ Trung tâm Tài nguyên Sinh học Quốc gia (Biological Resource Center, NBRC) của Nhật Bản và được lưu trữ tại Phòng thí nghiệm Công nghệ Sinh học Thực phẩm, Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ. Gạo lứt trắng IR50404, được mua tại chợ Hưng Lợi, Ninh Kiều, Thành phố Cần Thơ. Môi trường nuôi cấy nấm mốc được sử dụng là Malt Extract Agar (MEA; HiMedia, Ấn Độ). Các hóa chất bao gồm NaNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaOH, H_2SO_4 , CH_3COOH , $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, glycerol, glucose, peptone và yeast extract (Xilong, Trung Quốc) và chất chuẩn monacolin K (AstraZeneca, Anh).

2.2. Ảnh hưởng của pH đến quá trình sinh tổng hợp sắc tố và monacolin K

Nấm mốc *M. purpureus* được chuẩn bị trong ống thạch nghiêng và ủ ở 30°C trong 17 ngày. Thu dịch trích bào tử bằng cách cho 5 mL nước cất vô trùng vào ống thạch nghiêng. Gạo lứt trắng được chứa trong túi polypropylen (PP), bổ sung nước cất để đạt độ ẩm 40% và thanh trùng nhiệt ướt ở 121°C trong 30 phút. Gạo hấp được để nguội đến $38 - 40^\circ\text{C}$, bổ sung $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,5 M (0,00594 g/g cơ chất khô) và H_2SO_4 0,5 M (0,02 mL/g cơ chất khô) và điều chỉnh pH về 4, 5, 6, 7 bằng CH_3COOH 2N và NaOH 1N. Sau đó, chủng dịch trích bào tử vào cơ chất sao cho đạt mật số 10^6 bào tử/g cơ chất khô. Trộn đều cơ chất và ủ ở 30°C trong 22 ngày. Thí nghiệm được thực hiện lặp lại 3 lần. Hàm lượng sắc tố được xác định theo phương pháp của Babitha và cs. (2007): sấy khô gạo lên men ở 50°C trong 24 giờ, cân 0,5 g bột đã nghiền mịn cho vào 10 ml 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% và đo ở bước sóng 505 nm đối với sắc tố đỏ và 410 nm đối với sắc tố vàng. Mẫu đối chứng là ethanol 70%. Tổng số sắc tố hấp thụ (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 và cs. (2011). Thu dịch trong sau ly tâm, pha loãng với ethanol 70% và đo độ hấp thụ ở bước sóng 238 nm.

2.3. Ảnh hưởng của việc bổ sung nguồn nitrogen

Nấm mốc *M. purpureus* và dịch trích bào tử được chuẩn bị như thí nghiệm 2.2. Cơ chất được thanh trùng nhiệt ướt và điều chỉnh pH thích hợp được chọn từ thí nghiệm 2.2. Cơ chất được để nguội đến 38 - 40°C, bổ sung NaNO₃, (NH₄)₂SO₄, peptone và yeast extract với nồng độ 0,5%. Chúng dịch trích bào tử vào cơ chất sao cho đạt mật số 10⁶ bào tử/g cơ chất khô. Trộn đều cơ chất và ủ ở 30°C trong 22 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. Ảnh hưởng của việc bổ sung nguồn carbon

Nấm mốc *M. purpureus* và dịch trích bào tử được chuẩn bị như nội dung 2.2. Cơ chất được thanh trùng nhiệt ướt và điều chỉnh pH thích hợp được chọn từ nội dung 2.2. Cơ chất được để nguội đến 38 - 40°C và bổ sung nguồn nitrogen được chọn ở thí nghiệm 2.3. Tiếp theo, glucose được bổ sung vào môi trường với các nồng độ lần lượt là 0,5%, 1% và 2% (w/w); glycerol được bổ sung với các nồng độ lần lượt là 0,8%, 2,4%, 4% (v/w); ethanol tinh khiết được bổ sung vào sau khi môi trường hấp tiệt trùng với các nồng độ lần lượt là 0,3%, 0,5%, 0,7% (v/w). Tiến hành lên men như nội dung 2.2 và hàm lượng sắc tố và monacolin K được xác định ở ngày thứ 22 với mỗi nghiệm thức được thực hiện 3 lần lặp lại.

2.5. Khảo sát độ bền màu của sắc tố theo thời gian

Cân lượng chính xác bột gạo đỏ sau lên men hòa tan trong ethanol 70% làm giống như trích ly đo sắc tố. Thu dịch sau ly tâm và cho vào chai thủy tinh vắn kín nắp, lưu trữ trong điều kiện ánh sáng tự nhiên ở nhiệt độ phòng. Tiến hành đo độ hấp thu ở bước sóng 410 nm và 505 nm định kỳ 10 ngày 1 lần trong 30 ngày. Độ bền của dịch trích và bột màu được đánh giá bởi phần trăm màu còn lại sau 30 ngày quan sát. Công thức xác định % màu còn lại: % A còn lại = $A_t/A_0 \times 100$ (%). Trong đó, A_t: độ hấp thu của mẫu tại thời điểm t đo xác định (t = 0-30) A₀: độ hấp thu của mẫu tại bước sóng cực đại ban đầu với mỗi mẫu nghiên cứu (t = 0).

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 bằng phần mềm Statgraphics Centurion XVI (Statpoint Technologies Inc., Hoa Kỳ).

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Ảnh hưởng của pH đến quá trình sinh tổng hợp sắc tố và monacolin K

Độ pH ban đầu của môi trường sản xuất là nhân tố quan trọng ảnh hưởng đến sự phát triển của nấm và sự tổng hợp sắc tố cũng như sự hình thành monacolin K. Bảng 1 thể hiện hàm lượng sắc tố và monacolin K được xác định vào ngày thứ 22 của quá trình nuôi cấy.

Bảng 1. Ảnh hưởng của pH đến sự hình thành sắc tố và monacolin K

pH	Lượng sắc tố vàng (AU/g)	Lượng sắc tố đỏ (AU/g)	Lượng monacolin K (µg/g)
4	6852,93 ± 21,75 ^a	5026,13 ± 16,97 ^a	2095,12 ± 15,87 ^a
5	6880,32 ± 17,48 ^a	5129,52 ± 33,89 ^a	2155,37 ± 27,67 ^a
6	6044,83 ± 38,21 ^b	5257,47 ± 31,41 ^a	1846,13 ± 38,55 ^b
7	5984,67 ± 28,61 ^b	5035,33 ± 18,53 ^a	1478,19 ± 12,16 ^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 mẫu tự giống nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ở độ tin cậy 95%.

Kết quả ở Bảng 1 cho thấy nấm mốc *M. purpureus* có khả năng lên men và tổng hợp sắc tố ở khoảng pH được khảo sát. Kết quả này tương tự với báo cáo của Yongsmith và cs. (1993), nấm mốc *Monascus* đã được quan sát sự phát triển ở một loạt các giá trị pH từ 2,5 - 8,0 và cho thấy phạm vi hoạt động lý tưởng là 4,0 - 7,0. Ở thí nghiệm này là lượng

sắc tố vàng đạt cao nhất ở pH 4 - 5 (6.852,93 AU/g và 6.880,32 AU/g) và giảm dần khi tăng pH lên 6 và 7 (6.044,83 AU/g và 5.984,67 AU/g). Trong khi đó, lượng sắc tố đỏ sinh ra ở các mức pH không có sự khác biệt ý nghĩa về mặt thống kê và dao động trong khoảng 5.026,13 - 5.257,47 AU/g. Điều này cho thấy nấm sợi *Monascus* có xu hướng phát triển và hình

thành sắc tố ở pH acid tốt hơn là pH gần trung tính. Tuy nhiên việc sản xuất các sắc tố vàng và đỏ có sự khác nhau nếu có sự thay đổi pH ban đầu. Cụ thể là ở pH thấp hơn thì sẽ có ưu thế sinh tổng hợp các sắc tố màu vàng và ở độ pH cao hơn thì có ưu thế của sắc tố đỏ (Lin và Demain, 1991, Yongsmith và cs., 1993). Kết quả của nghiên cứu này phù hợp với kết quả trong một nghiên cứu trước đây của Lv và cs. (2017). Bên cạnh đó, trong nghiên cứu của Chen và John (1993) báo cáo hàm lượng sắc tố vàng đạt cao nhất ở pH 4 và sắc tố đỏ đạt cao nhất ở pH 6,5. Tương tự, Nguyễn Thị Xuân Hồng (2013) cũng cho rằng pH 4 tốt nhất cho việc tạo sắc tố vàng và pH 5,5 tốt nhất cho quá trình tạo sắc tố đỏ. Từ đó cho thấy pH ban đầu ảnh hưởng đến quá trình lên men và sự biến đổi sắc tố từ cam, vàng đến sắc tố đỏ. Các chất màu đỏ và vàng được tạo ra từ quá trình lên men có thay đổi bằng cách điều chỉnh thành phần môi trường và độ pH ban đầu của cơ chất lên men.

Bên cạnh các chỉ tiêu về hàm lượng sắc tố sinh ra, monacolin K cũng được xác định sau 22 ngày lên men trên nguồn cơ chất gạo lứt. Kết quả cho thấy lượng monacolin K hình thành và đạt cao nhất ở pH 5 với 2155,37 $\mu\text{g/g}$ và khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ở độ tin cậy 95% ở pH 4 (2095,12 $\mu\text{g/g}$). Tuy nhiên, khi tăng giá trị pH lên 6 thì hàm lượng monacolin K giảm mạnh và đạt thấp nhất ở pH 7 với 1478,19 $\mu\text{g/g}$. Kết quả này phù hợp với báo cáo của Subsaendee và cs. (2014) khi lên men gạo bởi *Monascus* sp. cho hàm lượng monacolin K cao nhất khi pH chất nền ở khoảng 5 và Nguyễn Thị Xuân Hồng (2013) cũng cho rằng pH 5 là tốt nhất cho việc tạo monacolin K của nấm *M. Purpureus*. Trong một nghiên cứu khác của Panda và cs. (2009), khi gạo được lên men bởi chủng *M. purpureus* MTCC 369, pH tối ưu của chất nền để sản xuất monacolin K là 6. Ngoài ra, khi sử dụng khoai mỡ là cơ chất lên men, chủng *M. purpureus* NTU301 tạo ra nhiều monacolin K hơn khi pH có tính acid và hàm lượng monacolin K cũng giảm dần khi pH tăng lên (Lee và cs., 2007). Từ kết quả nghiên cứu và các kết quả nghiên cứu trước đây có thể thấy rằng tùy thuộc vào sự tương tác giữa các chủng với chất nền hoặc các điều kiện lên men khác nhau thì giá trị pH tối ưu có thể khác nhau. pH được biết đến như một nhân tố tác động đến quá trình xúc tác của nhiều enzyme và sự vận chuyển các chất qua màng tế bào. Do đó, pH quá cao hoặc quá thấp ảnh hưởng đến việc sản xuất các enzyme quan

trọng cần thiết cho sự sinh tổng hợp monacolin K và trên dưới mức pH cụ thể nào đó sẽ tạo điều kiện kích hoạt một số enzyme phân hủy monacolin K dẫn đến giảm hàm lượng monacolin cuối cùng (Bizukoje và cs., 2012). Nhìn chung, từ những kết quả trên, pH 5 được chọn để thực hiện thí nghiệm tiếp theo.

3.2. Ảnh hưởng của nguồn nitrogen đến hàm lượng sắc tố và monacolin K

Tùy thuộc vào cơ chất lên men ban đầu mà một số nghiên cứu có thể không cần bổ sung nguồn nitrogen. Tuy nhiên, khi sử dụng các nguồn cơ chất không có hoặc có rất ít đạm thì việc bổ sung nguồn nitrogen sẽ kích thích sản xuất các loại sắc tố. Do đó, để cải thiện khả năng hình thành sắc tố vàng và đỏ cũng như monacolin K, các nguồn nitơ khác nhau đã được thêm vào môi trường lên men và kết quả được thể hiện ở Bảng 2.

Kết quả cho thấy hàm lượng sắc tố vàng và đỏ sinh ra đạt cao nhất khi môi trường gạo lứt được bổ sung đạm amonium với lượng sắc tố vàng là 6929,12 AU/g và đối với lượng sắc tố đỏ là 6280,02 AU/g. Khi bổ sung nguồn đạm hữu cơ gồm peptone và yeast extract thì lượng sắc tố sinh ra thấp hơn và giữa 2 nguồn này và không có khác biệt ý nghĩa về mặt thống kê. Hầu hết các chủng nấm đều có khả năng tận dụng nguồn nitơ vô cơ hoặc hữu cơ. Nitơ vô cơ có thể được cung cấp dưới dạng khí amoniac, muối amonium hoặc nitrate trong khi nguồn nitơ hữu cơ có thể được cung cấp dưới dạng acid amin, protein, peptone, yeast extract hoặc urea (Ariff, 1993). Các nghiên cứu trước đây của Broder và Koehler (1980), Juzlová và cs. (1996) cũng chỉ ra rằng các nguồn nitrogen tốt nhất được sử dụng để sản xuất sắc tố là muối amonium. Tuy nhiên, nghiên cứu của Gunasekaran và Poorniammal (2008) báo cáo rằng bổ sung peptone vào môi trường nuôi cấy làm tăng năng suất sắc tố đỏ cao nhất bởi *Penicillium* sp. và các loại nấm sản xuất sắc tố khác. Trong một nghiên cứu về thử nghiệm các nguồn nitrogen khác nhau lại cho thấy muối gốc nitrate cho khả năng sinh tổng hợp tối đa sắc tố vàng và đỏ với hàm lượng lần lượt là 5.280 AU/L và 5.080 AU/L. Các kết quả này đã cho thấy tùy theo cơ chất và điều kiện lên men cũng như các chủng nấm mà nguồn nitrogen được sử dụng có ảnh hưởng đến việc sản xuất các chất chuyển hóa có hoạt tính sinh học sơ cấp hoặc thứ cấp (Darwesh và cs., 2019).

Bảng 2. Ảnh hưởng của nguồn nitrogen đến sự hình thành sắc tố và monacolin K

Nguồn nitrogen	Lượng sắc tố vàng (AU/g)	Lượng sắc tố đỏ (AU/g)	Lượng monacolin K ($\mu\text{g/g}$)
Đối chứng	6865,59 \pm 29,18 ^b	5207,77 \pm 12,99 ^c	2127,15 \pm 8,11 ^c
Peptone	6856,56 \pm 9,87 ^b	5409,63 \pm 0,79 ^b	2161,72 \pm 3,83 ^b
Yeast extract	6862,16 \pm 32,23 ^b	5413,91 \pm 1,19 ^b	2118,56 \pm 8,00 ^c
(NH ₄) ₂ SO ₄	6929,12 \pm 34,82 ^a	6280,02 \pm 19,79 ^a	2314,35 \pm 24,29 ^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%.

Xét về hàm lượng monacolin K, kết quả cho thấy lên men gạo lứt có bổ sung muối amonium cũng sinh tổng hợp monacolin K với hàm lượng cao nhất là 2.314,35 $\mu\text{g/g}$ và có khác biệt ý nghĩa so với 2 nguồn đậm còn lại, lần lượt là 2.161,72 $\mu\text{g/g}$ đối với peptone và 2.118,56 $\mu\text{g/g}$ đối với yeast extract. Kết quả nghiên cứu của tác giả Vũ Thanh Thảo và cs. (2012) cũng cho thấy khi sử dụng NH₄Cl với nồng độ 0,5% là nguồn nitrogen có tác động lớn nhất đối với lượng monacolin K tạo thành. Trong báo cáo của Su và cs. (2003) thì NaNO₃ 0,1% cho hàm lượng monacolin K cao hơn so với yeast extract, peptone, natri glutamate và amonium sulfate khi lên men với cơ chất là gạo. Năm 2013, Kraboun và cs. đã nghiên cứu ảnh hưởng của việc thay đổi nồng độ natri glutamate và peptone đối với sự tạo thành monacolin K từ quá trình lên men *Monascus*. Các tác giả đã thấy rằng việc bổ sung natri glutamate cho

năng suất cao hơn so với peptone với cùng một hàm lượng nitơ. Tóm lại, theo thí nghiệm này thì nguồn đậm thích hợp cho quá trình chuyển hóa để tạo thành sắc tố và monacolin K là (NH₄)₂SO₄.

3.3. Ảnh hưởng của nguồn carbon đến hàm lượng sắc tố và monacolin K

Carbohydrate và protein là các nguồn dinh dưỡng quan trọng cho sự phát triển của nấm *Monascus* và tỷ lệ C và N trong môi trường có ảnh hưởng đến sự hình thành sắc tố. Do đó, việc tăng nồng độ C trong môi trường phải cân bằng với nồng độ N để đạt được sự phát triển tối đa và sự hình thành sắc tố. Các nguồn carbon khác nhau bao gồm glucose, glycerol và ethanol được bổ sung vào môi trường lên men để góp phần cải thiện việc sản xuất sắc tố vàng, đỏ và monacolin K. Kết quả hình thành sắc tố và monacolin K được trình bày trong Bảng 3.

Bảng 3. Ảnh hưởng của nguồn carbon đến sự hình thành sắc tố và monacolin K

Nguồn carbon	Lượng sắc tố vàng (AU/g)	Lượng sắc tố đỏ (AU/g)	Lượng monacolin K ($\mu\text{g/g}$)
Đối chứng	6867,20 \pm 36,87 ^b	6260,64 \pm 35,04 ^a	2241,86 \pm 2,05 ^d
Glucose - 0,5%	6760,47 \pm 18,22 ^c	6223,62 \pm 25,99 ^a	2244,70 \pm 22,99 ^d
Glucose - 1,0%	6758,59 \pm 17,08 ^c	6086,65 \pm 11,64 ^{ab}	2240,49 \pm 26,55 ^d
Glucose - 2,0%	5979,21 \pm 3,68 ^d	5972,35 \pm 1,186 ^b	2236,64 \pm 20,69 ^d
Glycerol - 0,8%	6946,71 \pm 25,96 ^a	6269,33 \pm 41,87 ^a	2574,45 \pm 12,37 ^a
Glycerol - 2,4%	6949,07 \pm 17,44 ^a	6265,33 \pm 15,60 ^a	2484,84 \pm 3,54 ^b
Glycerol - 4,0%	6962,17 \pm 25,58 ^a	6246,67 \pm 18,01 ^a	2464,43 \pm 5,33 ^b
Ethanol - 0,3%	6887,43 \pm 6,05 ^b	6220,43 \pm 5,32 ^{ab}	2279,88 \pm 4,42 ^c
Ethanol - 0,5%	6951,11 \pm 5,36 ^a	6282,35 \pm 10,23 ^a	2453,59 \pm 19,15 ^b
Ethanol - 0,7%	6960,02 \pm 26,37 ^a	6296,84 \pm 7,83 ^a	2464,84 \pm 43,03 ^b

*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%.

Glucose, oligo- và polysaccharide của glucose được hầu hết các nhà nghiên cứu báo cáo là nguồn carbon tốt hơn các nguồn carbon khác cho cả sự phát triển và sản xuất sắc tố (Yoshimura và cs., 1975; Lin và Demain, 1991; Krairak và cs., 1999; Tseng và cs., 2000). Tuy nhiên, trong thí nghiệm này việc bổ sung glucose cho thấy lượng sắc tố giảm đi so với đối chứng và hàm lượng sắc tố được tạo ra tỉ lệ nghịch với nồng độ glucose. Cụ thể là khi bổ sung glucose với nồng độ 0,5% thì lượng sắc tố vàng và đỏ đạt lần lượt là 6.760,47 AU/g và 6.223,62 AU/g và có xu hướng giảm mạnh khi nồng độ glucose ở mức 2,0 % với hàm lượng sắc tố vàng là 5.979,2 AU/g và hàm lượng sắc tố đỏ là 5.972,35 AU/g. Nguyên nhân có thể là trong quá trình phát triển, *Monascus* đã tiết ra nhiều loại enzyme để phân cắt tinh bột có trong gạo lứt thành glucose. Do đó, việc bổ sung glucose đã làm tăng nồng độ glucose và gây ra hiệu ứng Crabtree, từ đó sẽ ức chế sự hình thành các chất chuyển hóa thứ cấp, giảm sự phát triển tế bào và cũng như hình thành sắc tố (Chen và Johns, 1993).

Có thể thấy glucose là một nguồn carbon quan trọng nhưng nếu không được sử dụng ở nồng độ thích hợp sẽ gây kìm hãm trong quá trình hình thành sắc tố. Việc sử dụng một nguồn carbon khác có thể tránh được tác dụng này, trong đó ethanol là một nguồn carbon thay thế tốt (Juzlová và cs., 1996) và được sản xuất tự nhiên bởi nấm trong điều kiện hạn chế oxy hoặc dư thừa glucose (Pastrana và cs., 1995; Hamdi và cs., 1996). Kết quả từ Bảng 3 cho thấy khi bổ sung ethanol với các nồng độ khác nhau thì hàm lượng sắc tố vàng nằm trong khoảng 6.887,43 - 6.960,02 AU/g và lượng sắc tố đỏ nằm trong khoảng 6.220,43 - 6.296,84 AU/g. Trong nghiên cứu của Kranz và cs. (1992), ethanol ở nồng độ 2% (v/v) được sử dụng làm nguồn carbon duy nhất để sản xuất sắc tố bởi *M. purpureus* và hàm lượng sắc tố thu được cao hơn so với sản xuất sắc tố khi lên men bằng maltose. Tuy vậy, cho đến nay, ethanol đóng vai trò trong việc hỗ trợ sản xuất sắc tố với tốc độ lớn hơn một số loại đường. Song, ethanol vẫn chưa được nghiên cứu kỹ lưỡng như một nguồn carbon duy nhất để sản xuất sắc tố và việc kích thích sản xuất sắc tố bằng ethanol như một nguồn carbon ở một số chủng *Monascus* có thể là hình thành một lượng acetyl CoA cao hơn trong tế bào (Krairak và cs., 1999).

Bên cạnh các nguồn carbon được quan tâm như các loại đường đơn, đường đôi hay đường đa thì glycerol cũng được sử dụng làm nguồn carbon duy nhất cho các quá trình lên men chìm của *Monascus*. Các nghiên cứu báo cáo rằng glycerol có hoạt tính chuyển hóa mạnh hơn sucrose và tinh bột vì nó có thể được chuyển đổi trực tiếp thành dihydroxyacetone để đường phân (Dobson và cs., 2012; Li và cs., 2013). Do đó, glycerol được đồng hóa nhanh và làm tăng tốc độ tăng trưởng cũng như thúc đẩy sự tích tụ sắc tố. Trong nghiên cứu của Embaby và cs. (2018) cũng chỉ ra rằng việc bổ sung glycerol cho quá trình lên men ở trạng thái rắn lõi ngô làm tăng khả năng sản xuất sắc tố của chủng *M. purpureus* ATCC 16436. Glycerol như một chất cảm ứng sắc tố hiệu quả, chi phí thấp, được chọn làm chất đồng cảm ứng cùng với lõi ngô cho sắc tố *Monascus* thay vì glucose. Bảng 3 cũng cho thấy sự hình thành sắc tố vàng và đỏ khi bổ sung glycerol với các nồng độ khác cho kết quả cao hơn glucose.

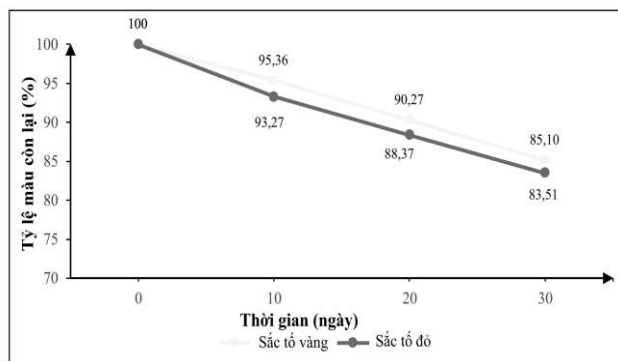
Việc bổ sung nguồn carbon vào cơ chất rắn là những phương pháp hiệu quả để tăng sản lượng monacolin K. Trong đó, glucose có thể thúc đẩy tăng trưởng và sản xuất monacolin K. Suraiya và cs. (2018) đã tối ưu hóa bằng phương pháp bề mặt đáp ứng và nhận thấy rằng lượng bổ sung glucose tối ưu vào môi trường rắn là 1,32%. Tuy nhiên, trong nghiên cứu này, glucose được bổ sung vào môi trường gạo lứt có sự khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê so với đối chứng. Một nghiên cứu khác của Wang và cs. (2003) cho thấy khi thêm 0,3% ethanol làm nguồn carbon vào môi trường có thể làm tăng đáng kể năng suất monacolin K và giảm hàm lượng citrinin. Kết quả tương tự ở Bảng 3, khi bổ sung ethanol với nồng độ từ 0,3% đến 0,7% thì hàm lượng monacolin K cũng tăng từ 2.279,88 µg/g đến 2.464,84 µg/g. Ngoài ra, glycerol cũng thường được sử dụng làm nguồn carbon cho quá trình lên men monacolin K. Khi 0,8% glycerol được bổ sung vào cơ chất gạo lứt thì lượng monacolin K đạt cao nhất (2.574,45 µg/g) và khác biệt có ý nghĩa với các nồng độ còn lại cũng như các nguồn carbon khác. Khi nồng độ glycerol đạt 4,0% thì hàm lượng monacolin K có xu hướng giảm. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Nguyễn Thị Xuân Hồng (2013), Zhang và cs. (2013), Feng và cs. (2015). Nhìn chung, bổ sung glycerol ở

nồng độ 0,8% là phù hợp cho sự tổng hợp sắc tố và monacolin K.

3.4. Độ bền màu của sắc tố theo thời gian

Sau khi xác định được các điều kiện thích hợp cho quá trình lên men bề mặt rắn để sinh tổng hợp sắc tố và monacolin K từ *M. purpureus*. Mẫu sắc tố được lưu trữ ngoài ánh sáng tự nhiên ở nhiệt độ phòng để đánh giá độ bền của dịch trích.

Sau 30 ngày theo dõi, kết quả cho thấy sắc tố vàng và đỏ có sự suy giảm theo thời gian trong điều kiện tự nhiên (Hình 1). Cụ thể là sau 10 ngày sắc tố vàng giảm còn 95,36% và sắc tố đỏ còn 93,27%. Sau 30 ngày thì vẫn giữ ở mức 85,10% và 83,51% so với ban đầu, tương ứng với lượng sắc tố vàng và đỏ mất đi là 14,90% và 16,49%. Các chất màu có nguồn gốc từ *Monascus* khá bền đối với quá trình hấp tiết trùng cũng như có khoảng pH rộng nhưng bền hơn ở pH cao hơn hoặc gần trung tính (Lin và cs., 1992; Lee và Chen 2000). Tuy nhiên, các chất màu không bền với ánh sáng (chỉ còn lại 20% màu sau 50 ngày) và nhiệt (45% màu còn lại sau 2 giờ ở 100°C). Theo Fabre và cs. (1993), xúc xích hoặc pate được nhuộm bằng sắc tố đỏ của *Monascus* thể hiện màu còn lại dao động trong khoảng 92 đến 98% sau ba tháng khi trữ ở 4°C và được đánh giá cảm quan khá tốt. Các chất màu tự nhiên thường bị suy giảm màu sắc trong quá trình bảo quản nên vấn đề nghiên cứu để giữ ổn định độ màu cũng được quan tâm đối với từng sản phẩm cụ thể vì độ bền màu còn phụ thuộc vào đặc tính của từng sản phẩm (pH, thành phần các hợp chất hữu cơ, phương pháp bảo quản...) (Chattopadhyay và cs., 2008; Mapari và cs., 2010; Gmoser và cs., 2017). Tuy nhiên, với kết quả bước đầu đạt được, sau 1 tháng tồn trữ trong dung môi ethanol thì tỷ lệ màu mất đi cũng chỉ ở khoảng 14,90 - 16,59% cho thấy khả năng duy trì tốt của cả hai loại sắc tố này. Ngoài ra, việc sử dụng chất tạo màu với nồng độ thích hợp nhằm đảm bảo duy trì màu sắc sản phẩm trong suốt quá trình bảo quản cũng được quan tâm. Với kết quả này, các sắc tố được hình thành từ *Monascus* là chất phụ gia tạo màu đầy hứa hẹn để sử dụng trong thực phẩm như là các chất màu tự nhiên và đảm bảo an toàn thực phẩm.



Hình 1. Độ bền màu của sắc tố theo thời gian

4. Kết luận

Nhằm cải thiện khả năng hình thành sắc tố và monacolin K, nghiên cứu đã xác định giá trị pH thích hợp và các nguồn dinh dưỡng bổ sung vào môi trường lên men ban đầu. Khi nuôi cấy *Monascus* ở pH 5, môi trường được bổ sung 0,5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ và 0,8% glycerol thì hàm lượng sắc tố vàng, sắc tố đỏ và monacolin K thu được lần lượt là 6.946,71 AU/g, 6.269,33 AU/g và 2.574,45 $\mu\text{g/g}$. Bên cạnh đó, khảo sát độ bền màu của các loại sắc tố cho thấy ứng dụng tiềm năng để sản xuất các chất màu tự nhiên phục vụ trong công nghiệp thực phẩm, điển hình như ứng dụng trong sản xuất chao đỏ, nước sốt cà chua, tương ớt... để giảm lượng ớt sử dụng cũng như thay thế các hợp chất màu hóa học.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu được thực hiện thông qua sự tài trợ kinh phí của Trường Đại học Cần Thơ thông qua đề tài nghiên cứu khoa học cấp cơ sở (mã số: T2020-105).

Tài liệu tham khảo

- Ariff, A. B. (1993). *The influence of mode of operation on the production of glucoamylase by Aspergillus awamori*. University of Manchester, Manchester, UK.
- Babitha, S. S., Soccol, C. R., and Pandey, A. (2007). Solid-state fermentation for the production of *Monascus* pigments from jackfruit seed. *Bioresource Technology*, 98(8), 1554-1560
- Bizukojc, M., Pawlak, M., Boruta, T., and Gonciarz, J. (2012). Effect of pH on biosynthesis of

- lovastatin and other secondary metabolites by *Aspergillus terreus* ATCC 20542. *Journal of Biotechnology*, 162(2-3), 253-261.
- Broder, C. U. and Koehler, P. E. (1980). Pigments produced by *Monascus purpureus* with regard to quality and quantity. *Journal of Food Science*, 45(3), 567-569.
- Chattopadhyay, P., Chatterjee, S., and Sen, S. K. (2008). Biotechnological potential of natural food grade biocolorants. *African Journal of Biotechnology*, 7(17), 2972-2985.
- Chen, M. H. and Johns, M.R., (1993). Effect of pH and nitrogen source on pigment production by *Monascus purpureus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 40, 132-138.
- Darwesh, O. M., Matter, I. A., Eida, M. F., Moawad, H., and Oh, Y. K. (2019). Influence of nitrogen source and growth phase on extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using cultural filtrates of *Scenedesmus obliquus*. *Journal of Applied Sciences*, 9, 1465.
- Dobson, R., Gray, V., and Rumbold, K. (2012). Microbial utilization of crude glycerol for the production of value-added products. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 39(2), 217-226.
- Embaby, A. M., Hussein, M. N., and Hussein, A. (2018). *Monascus* orange and red pigments production by *Monascus purpureus* ATCC16436 through co-solid state fermentation of corn cob and glycerol: An eco-friendly environmental low cost approach. *Plos One*, 13(12), 1-18.
- Fabre, C. E., Santerre, A. L., Loret, M. O., Baberian, R., Pareilleux, A., Goma, G., and Blanc, P. J. (1993). Production and food applications of the red pigments of *Monascus ruber*. *Journal of Food Science*, 58(5), 1099-1102.
- Feng, Y., Shao, Y., and Chen, F. (2012). *Monascus* pigments. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96, 1421-1440.
- Feng, Y. L., Shao, Y. C., Zhou, Y. X., and Chen, F. S. (2015). Effects of glycerol on pigments and monacolin K production y the high-monacolin K-producing but citrinin-free strain, *Monascus pilosus* MS-1. *European Food Research and Technology*, 240(3), 635-643.
- Gmoser, R., Ferreira, J. A., Lennartsson, P. R., and Taherzadeh, M. J. (2017). Filamentous ascomycetes fungi as a source of natural pigments. *Fungal Biology and Biotechnology*, 4(1), 1-25.
- Gunasekaran, S. and Poorniammal, R. (2008). Optimization of fermentation conditions for red pigment production from *Penicillium* sp. under submerged cultivation. *African Journal of Biotechnology*, 7, 1894-1898.
- Hamdi, M., Blanc, P. J., and Goma, G. (1996). Effect of aeration conditions on the production of red pigments by *Monascus purpureus* growth on prickly pear juice. *Process Biochemistry*, 31(6), 543-547.
- Juzlová, P., Martínková, L., and Kren, V. (1996). Secondary metabolites of the fungus *Monascus*: A review. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 16, 163-170.
- Kraboun, K., Tochampa, W., Chatdamrong, W., and Kongbangkerd, T. (2013). Effect of monosodium glutamate and peptone on antioxidant activity of monascical waxy corn. *International Food Research Journal*, 20(2), 623-631.
- Krairak, S., Yamamura, K., Nakajima, M., Shimizu, H., and Anage, P. C. (1999). Maximum yellow pigment production utilizing a fed-batch culture. *Biotechnology for Sustainable Utilization of Biological Resources in the Tropics*, 14, 210-216.
- Kranz, C., Panitz, C., and Kunz, B. (1992). Biotransformation of free fatty acids in mixtures to methyl ketones by *Monascus purpureus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 36(4), 436-439.
- Lee, Y. K. and Chen, D. C. (2000). Applications of *Monascus* pigments as food colorant in www. allok.com/literature.

- Lee, C. L., Hung, H. K., Wang, J. J., and Pan, T. M. (2007). Improving the ratio of monacolin K to citrinin production of *Monascus purpureus* NTU 568 under dioscorea medium through the mediation of pH value and ethanol addition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(16), 6493-6502.
- Li, C., Lesnik, K. L., and Liu, H. (2013). Microbial conversion of waste glycerol from biodiesel production into value-added products. *Energies*, 6(9), 4739-4768.
- Lin, T. F. and Demain, A. L. (1991). Effect of nutrition of *Monascus* sp. on formation of red pigments. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 36, 70-75
- Lin, T. F., Yakushijin, K., Büchi, G. H., and Demain, A. L. (1992). Formation of water-soluble *Monascus* red pigments by biological and semi-synthetic processes. *Journal of Industrial Microbiology*, 9, 173-179.
- Lv, J., Zhang, B. B., Liu, X. D., Zhang, C., Chen, L., Xu, G. R., and Cheung, P. C. K. (2017). Enhanced production of natural yellow pigments from *Monascus purpureus* by liquid culture: the relationship between fermentation conditions and mycelial morphology. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 124(4), 452-458.
- Malik, K., Tokkas, J., and Goyal, S. (2012). Microbial pigments: A review. *International Journal of Microbial Resource Technology*, 1, 361-365.
- Mapari, S. A., Thrane, U., and Meyer, A. S. (2010). Fungal polyketide azaphilone pigments as future natural food colorants. *Trends in Biotechnology*, 28(6), 300-307.
- Nguyễn Thị Xuân Hồng (2013). *Nghiên cứu khả năng tạo sắc tố đỏ và monacolin K từ vi nấm Monascus purpureus*. Luận văn Thạc sĩ Sinh học. Trường Đại học Sư phạm Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam.
- Panda, B. P., Javed, S., and Ali, M. (2009). Statistical analysis and validation of process parameters influencing lovastatin production by *Monascus purpureus* MTCC 369 under solid-state fermentation. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 14(1), 123-127.
- Pastrana, L., Blanc, P. J., Santerre, A. L., Loret, M. O., and Goma, G. (1995). Production of red pigments by *Monascus ruber* in synthetic media with a strictly controlled nitrogen source. *Process Biochemistry*, 30(4), 333-341.
- Sigurdson, G., Tang, P., and Giusti, M. M. (2017). Natural colorants: Food colorants from natural sources. *Annual Review of Food Science and Technology*, 8, 261-280.
- Su, Y. C., Wang, J. J., Lin, T. T., and Pan, T. M. (2003). Production of the secondary metabolites γ -aminobutyric acid and monacolin K by *Monascus*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30(1), 41-46.
- Subsaendee, T., Kitpreechavanich, V., and Yongsmith, B. (2014). Growth, glucoamylase, pigments and monacolin K production on rice solid culture in flask and koji chamber using *Monascus* sp. KB9. *Chiang Mai Journal of Science*, 41(5.1), 1044-1057.
- Sun, J. L., Zou, X., Liu, A. Y., and 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.
- Suraiya, S., Kim, J. H., Tak, J. Y., Siddique, M. P., Young, C. J., and Kim, J. K. (2018). Influences of fermentation parameters on lovastatin production by *Monascus purpureus* using *Saccharina japonica* as solid fermented substrate. *Food Science and Technology*, 92,1-9.
- Tseng, Y. Y., Chen, M. T., and Lin, C. F. (2000). Growth, pigment production and protease activity of *Monascus purpureus* as affected by salt, sodium nitrite, polyphosphate and various sugars. *Journal of Applied Microbiology*, 88(1), 31-37.
- Tuli, H. S., Chaudhary, P., Beniwal, V., and Sharma, A. K. (2015). Microbial pigments as natural color

- sources: Current trends and future perspective. *Journal of Food Science and Technology*, 52(8), 4669-4678.
- Vũ Thanh Thảo, Huỳnh Bái Nhi, Cao Thị Hồng Gấm và 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*, 15(1), 195-202.
- Wang, J. J., Lee, C. L. and Pan, T. M. (2003). Improvement of monacolin K, γ -aminobutyric acid and citrinin production ratio as a function of environmental conditions of *Monascus purpureus* NTU 601. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30(11), 669-676.
- Yongsmith, B., Tabloka, W., Yongmanitchai, W., and Bavavoda, R. (1993). Culture conditions for yellow pigment formation by *Monascus* sp. KB 10 grown on cassava medium. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 9, 85-90.
- Yoshimura, M., Yamanaka, S., Mitsugi, K., and Hirose, Y. (1975). Production of *Monascus* pigment in a submerged culture. *Agricultural Biological Chemistry*, 39(9), 1789-1795.
- Zhang, L., Li, Z., Dai, B., Zhang, W., and 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.