

Mikrobiálna príprava monaskových farbív a ich potravinárske aplikácie

DUŠAN SLUGEN - MÁRIA ŠTURDÍKOVÁ - MICHAL ROSENBERG

SÚHRN. Súčasný stav poznatkov o mikrobiálnej produkcii pigmentov vláknitými hubami *Monascus* sp. je prehľadne spracovaný. Článok podáva prehľad o základe substrátovej regulácie produkcie pigmentov a diskutuje perspektívne smery aplikácie takýchto produktov do potravín. Zvláštna pozornosť je venovaná možnosti aplikácie monaskových pigmentov z hľadiska hygieny a toxikológie, nakoľko môžu byť považované za nové aditíva prírodného pôvodu s dosiaľ neukončeným legislatívnym procesom. Výťažky, objemová produktivita i cena pigmentov pripravených v režime polosuchých kultivácií jasne prevážujú nad submerzným procesom. Výhody a nevýhody oboch režimov kultivácie sú porovnávané.

Legislatívne obmedzenia červených syntetických farbív stimulujú záujem o farbivá prírodného pôvodu. Spomedzi farbív syntetizovaných mikroorganizmami majú praktický potravinársky význam najmä farbivá karotenoidné a pigmenty syntetizované vláknitými hubami rodu *Monascus*. Kým situácia na trhu karotenoidných látok ako prekursoru β -karoténu je jasná (syntetickému β -karoténu mikrobiálny cenovo konkurovať nevládze, pretože jeho hlavné použitie je do kŕmnych zmesí), pre monaskové pigmenty neexistuje syntetická alternatíva. Výhodou monaskových pigmentov je ich zvýšená termostabilita v porovnaní s rastlinnými farbivami.

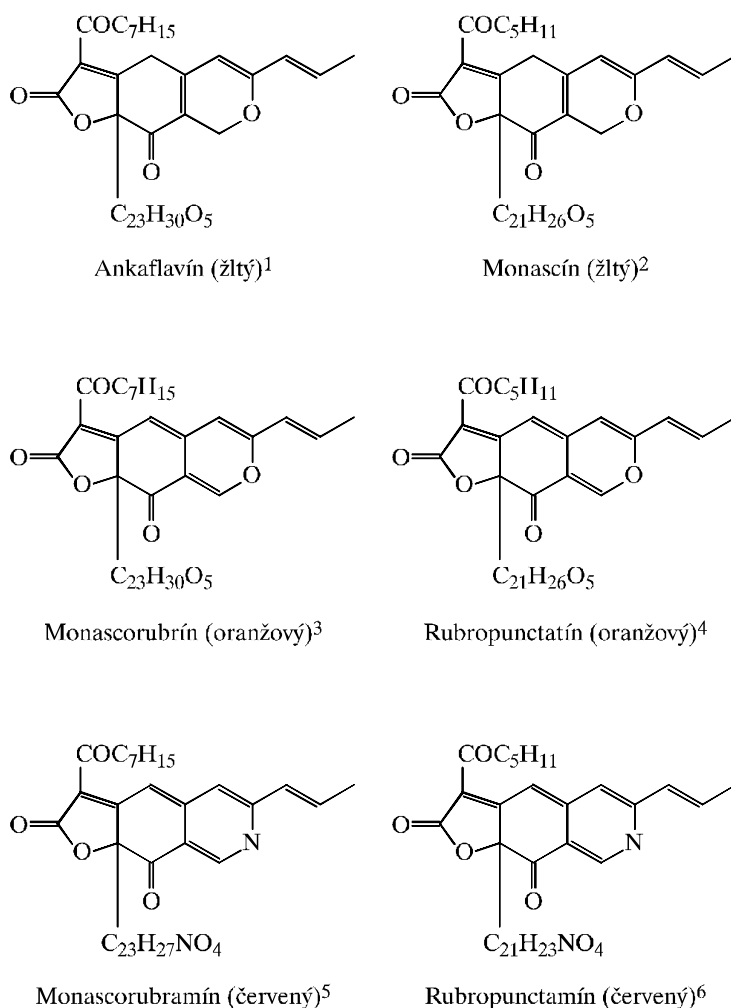
Pigmenty produkované rodom *Monascus*

Huby rodu *Monascus* patria do triedy *Ascomycetes*, čeľaď *Aspergillaceae*. Tvorba pigmentov nie je nevyhnutným znakom tohoto rodu. U niektorých kmeňov schopnosť tvorby pigmentov abscentuje, alebo sa obmedzuje len na žlté sfarbenie. Za podmienok nevhodných pre tvorbu pigmentov, nie sú

Ing. Dušan SLUGEN, Ing. Mária ŠTURDÍKOVÁ, CSc., Doc. Ing. Michal ROSENBERG, CSc.,
Katedra biochemickej technológie, Chemickotechnologická fakulta STU, Radlinského 9,
912 37 Bratislava.

tieto syntetizované. V prírode sa s nimi stretávame ako kontaminantami na povrchu siláží a pri aeróbnom rozklade materiálov obsahujúcich škrob.

Tvorbu farbív ovplyvňujú pH, aminokyseliny v kultivačnom médiu, teplota kultivácie a intenzita aerácie kultivačného média s optimom teploty 30 °C pre tvorbu pigmentov [1]. Vytvorené pigmenty sú polyketidového charakteru. Molekulárna štruktúra šiestich z nich, podľa [2,3] je na obr. 1.



OBR. 1. Štruktúra a farba základných pigmentov rodu *Monascus*.

FIG. 1. Structure and colour of basic *Monascus* sp. pigments.

1 - ankaflavine (yellow), 2 - monascine (yellow), 3 - monascorubine (orange), 4 - rubropunctatine (orange), 5 - monascorubramine (red), 6 - rubropunctamine (red).

Farebné spektrum pigmentov obsahuje tri maximá: pri 400, 470 a 500 nm. Prvé zodpovedá žltým pigmentom, druhé oranžovým a tretie červeným. Ich pomer závisí od podmienok, za ktorých sa kultivácia uskutočnila, od použitého zdroja uhlíka a dusíka. Predpokladá sa, že spoločným prekursorom je oranžovočervený monascorubrín. Nízke pH a nedostatok kyslíka favorizuje tvorbu žltých pigmentov (redukované formy), neutrálne pH je optimálne pre syntézu červených pigmentov. Stimulačne na biosyntézu žltých pigmentov pôsobí polypeptón, amónne soli podporujú produkciu oranžových. Na zvýšenie tvorby červených spolu so žltými sú vhodným prídavkom aminokyseliny, kvasničný autolyzát a glutaman. Absorpčné spektrá sa môžu počas kultivácie meniť, ich zmena býva často spôsobená posunom pH [4].

Farebné spektrum sa môže posunúť i dôsledkom mutácií. Boli izolované mutanty produkujúce žlté pigmenty s absorpčným maximom 370 nm [5].

Použitie pigmentov rodu *Monascus*

Huby rodu *Monascus* boli používané veľmi dlho pre produkciu potravinárskych farbív. Najznámejšie mikrobiálne farbivá sú produkované skupinou *Monascus anka* a *Monascus purpureus* [6,7].

V literatúre je popísané využitie takýchto farbív pre rozličné výrobky. Najrozšírenejšími tradičnými aplikáciami sú farbenie likérov a alkoholických nápojov, rastlinných proteínov, ako aditívne tabletky pre potraviny, sú tiež súčasťou tradičnej čínskej medicíny. Nové aplikácie otvára derivatizácia východiskových štruktúr pigmentov [8].

Rastlinné syry („tofu“), fermentované hubou *Monascus* sp. („sufu“ alebo „tofuyo“) majú v juhovýchodnej Ázii a Japonsku temer rovnaké miesto ako plesňovo zreté syry Západu. Pri fermentácii sa využíva proteolytický a amylolytický aparát húb *Amylomyces rouxii* a *Monascus* sp. v chránených podmienkach nálevu so zníženou aktivitou vody [9].

Fermentácia syra v náleve pripravenom z monascového koji neznamená len hydrolytickú degradáciu polymérov za účelom dosiahnutia sladkej chuti s mäsovou príchuťou, ale i produkciu chuťových a vôňových látok dodávajúcich produktu osobitne lahodnú arómu. Vôňa je tvorená esterami pochádzajúcimi z destilátu ryžového vína použitého pri príprave nálevu a súčasne činnosťou proteáz a lipáz z monascového koji. Amylolytický enzýmový komplex môže pochádzať z *Amylomyces rouxii*, no postačujú i amylázy rodu *Monascus* [9]. Sprievodným znakom je červenkastá farba produktov dodávajúca bielemu tofu tón blízky mäsovým výrobkom.

Tradičnou doménou využitia monascového koji je výroba „ang-kak“ likéru. Naprodukované amylázy v koji po zaliatí vodou a inokulácii osmofilnými kvasinkami *Zygosaccharomyces rouxii* vytvoria alkoholický produkt podobný ryžovému vínu. Na rozdiel od ryžového vína je použitej vody menej. Činnosťou amyláz vznikne sladký kašovitý roztok dextrínov a glukózy, ktorý svojou nízkou a_v zabráni úplnej konverzii na etanol, takže výsledný produkt má sladkú chuť. Navyše, pigmenty z koji sú vo výslednom roztoku vďaka rastúcej koncentrácii etanolu prítomné v rozpustenej podobe, čo dodáva nápoju oranžovo-červenú farbu. Pije sa po filtrácii ako aperitív buď priamo, alebo sa konzervuje prídavkom malého množstva destilátu awamori. Pripisujú sa mu preventívno-liečivé účinky [10].

Farbiaca mohutnosť ankaku je blízka sušenej červenej paprike. Farebné spektrum s dvoma maximami pri 400 a 500 nm je priaznivejšie než u papriky, a tak neprekvapuje úsilie o zavedenie monaskových pigmentov všade tam, kde sa používa červená paprika a nie je nevyhnutná papriková chuť.

Intenzívne je študovaná možnosť aplikácie červených pigmentov do mäsových výrobkov, najmä do mäkkých salám. Používajú sa ako čiastočná náhrada dusitanov pri vyfarbovaní mäsových výrobkov bez nepriaznivého dopadu na senzorickú kvalitu a farebnú stabilitu [11,12]. Farebná stabilita po nákroji získaných produktov je výrazne lepšia. Antimikrobiálnu aktivitu extraktov uplatňujúcu sa v mäsových výrobkoch je potrebné posudzovať obzvlášť opatrne. Pod názvom „červená ryža“ boli dovezené preparáty odskúšané ako aditíva do mäkkých tepelne upravovaných výrobkov i na Slovensku.

V budúcnosti namiesto fermentovaného materiálu obsahujúceho pigmenty možno predpokladať aplikácie buď prečistených alebo derivatizovaných preparátov vo forme kryštálov, oleorezínov alebo vo väzbe na nosiče. Nízka rozpustnosť pigmentov vo vode (okrem červených) favorizuje derivatizáciu pred purifikáciou.

Derivatizácia pigmentov cez väzbu na chitózan vedie k termostabilným produktom vhodným na extrúzne farbenie sójových produktov. Derivatizácia cez etanolamín umožňuje farbiť likéry a vermúty na červeno, čím sa blížime k tradičnej aplikácii monascového koji na „ang-kak“ likér a „metaiuzu“. Derivatizácia väzbou na galaktózamín umožňuje pripravovať zaujímavo sfarbené minerálne vody [13]. Chitín-viazané červené pigmenty možno s výhodou aplikovať na farbenie jogurtov [13].

Záujem mliekárni podnietil štúdium produkcie farbív na srvátke, avšak kultivácia nepriniesla očakávané výsledky. Vysoký obsah proteínov v sladkej srvátke inhibuje produkciu pigmentov. Zvýšenie množstva celkových i rozpustných pigmentov možno dosiahnuť ultrafiltráciou srvátky alebo jej zriedením roztokom škrobu [14].

Matsunaga [15] patentoval prípravu bioaktívneho červeného ovocného octu kokultiváciou *Monascus* sp. s osmofilnými kvasinkami produkujúcimi etanol v prítomnosti octových baktérií.

Schopnosť konvertovať nižšie mastné kyseliny na vôňové metylketóny je u rodu *Monascus* porovnateľná s *Penicillium roqueforti* [16], a tak možno predpokladať i aplikácie v syrárstve. Štruktúra mastných kyselín v mikrobiálnom lipide je blízka zloženiu lipidov rodu *Aspergillus* so stredným stupňom nenasýtenosti a s dominantným obsahom kyseliny olejovej a linolovej, ktoré spolu tvoria vyše 70 % všetkých prítomných mastných kyselín [14,17].

Biologicky aktívne sekundárne metabolity rodu *Monascus*

Obmedzenie rozsahu potravinársky využiteľných farbív ako i rastúci záujem o látky prírodné zvýšili záujem o pigmenty rodu *Monascus*. Kategorickou požiadavkou pre potravinárske aplikácie vláknitých húb je absencia toxínov a biologicky aktívnych látok.

V rozpore s touto požiadavkou tradičná čínska medicína už po stáročia využíva červenú ryžu na konzerváciu potravín a liečbu črevných a obehových ťažkostí [18]. Objav antibakteriálnej aktivity [18,19] kmeňov rodu *Monascus* môže čiastočne vysvetliť podstatu biologickej aktivity fermentovaných produktov. Kaio [20] ukázal, že pigmenty sú netoxické pre myši a potkany. Metabolity kmeňov rodu *Monascus* majú pozitívny účinok na zníženie a úpravu hladiny krvného cholesterolu [21] a sú ďalej intenzívne študované [22,23].

Bola izolovaná antibakteriálna aktivita dvoch kmeňov rodu *Monascus*, ktorá bola nazvaná monascidín A Wongom a Bau [18]. Monascidín A bol neskôr identifikovaný ako citrinín na základe rôznych analytických metód [24]. Citrinín je neurotoxický metabolit produkovaný mnohými hubami a má teratogénne účinky. Pretože citrinín je toxický, je dôležité, aby pri produkcii červených pigmentov rodom *Monascus* pre potravinárske účely boli selektované kmene neprodukujúce citrinín a upravené podmienky kultivácie a izolácie pigmentov tak, aby sa v maximálnej miere znížilo možné riziko [25-27].

Spomedzi sekundárnych metabolitov bol minimálne u troch preukázaný inhibičný účinok na rast baktérií. Oranžové pigmenty, monascorubrín a rubropunctatín vykazujú v koncentrácii 0,5 mg/papierový disk o priemere 8 mm inhibičnú zónu za použitia testovacích kultúr *Escherichia coli* a *Bacillus subtilis* o priemere 12,5, 13,4 mm resp. 14,9, 13,6 mm. Z ankaku bol izolovaný i ďalší bezfarebný α,β -nenasýtený γ -laktón poskytujúci zóny 10 a 10,2 mm [28].

Uskutočnili sa toxické štúdie monaskových pigmentov, ale ich toxicity neboli dostatočne jasne definované. Akútna orálna a intraperitoneálna toxicita je LD₅₀ 33,3 g a 8,7 g.kg⁻¹ váhy tela. Niektoré komerčné preparáty pigmentov majú zvýšený efekt na pečňové enzýmy potkanov vo fetálnom štádiu dôležité pri detoxikačných procesoch [29]. Pri testoch laboratórne pripravených preparátov na kuracích embryách bola detegovaná ich mutagenicita a teratogenicita [26]. Z hľadiska aplikácií je pozoruhodné, že u submerzne produkovaných pigmentov sú vedľajšie bioaktívne účinky pozorované častejšie než u pigmentov pripravených iným spôsobom.

Toxický účinok produktov fermentácie možno odstrániť:

- a) odstránením toxických produktov pri izolácii čistých pigmentov,
- b) derivatizáciou toxických komponentov [3].
- c) výberom netoxických kmeňov a mutačným šľachtením.

Mutačným šľachtením zameraným na zvýšenie podielu červených pigmentov možno pripraviť kmene iba so stopovou antibakteriálnou aktivitou, čo sa už opakovanne podarilo nezávislým skupinám výskumníkov [11]. Otvorenou zostáva otázka legislatívy produktov získaných použitím mutovaných a geneticky manipulovaných kmeňov ako potravinového aditíva.

Aplikácia pigmentov rodu *Monascus* do potravín, zvlášť do mäsových výrobkov [11,12], je podmienená dôkladným testovaním na sprievodné vedľajšie účinky, ktoré možno u sekundárnych metabolitov očakávať, obzvlášť ak nejde o čistú látku, ale o zmes derivátov jednej základnej štruktúry.

Záujem o hľadanie sekundárnych metabolitov diskvalifikujúcich potravinárske použitie niektorých produkčných kmeňov je dokladom rastúcej komercializácie ich použitia. Pripomína situáciu spred 20-tich rokov v oblasti plesňovozretých syrov a trvanlivých salám, kde firemne akvizitované hľadanie schopnosti produkcie citrinínu u kmeňov *Penicillii* viedlo k výraznej redukcii počtu kmeňov vyhovujúcich i najprísnejším kritériám. Firma, ktorá túto akciu iniciovala, mala pripravené štyri kmene - polovicu zo všetkých kmeňov, ktoré v teste uspeli [30,31].

Substrátová regulácia biosyntézy pigmentov rodom *Monascus*

Syntéza sekundárnych metabolitov je spravidla spojená so substrátovou limitáciou rastu, indukciou sporulácie a prebytkom hexóz utilizovaných prevažne Embden-Meyerhof-Parnas-ovou dráhou vstupujúcou do Krebsovho cyklu. Pre syntézu zásobných štruktúr a metabolitov s vysokým stupňom nenasýtenosti je potrebný prebytok redukovaných nikotínamidfosfátových

prenášačov, ktorých tvorba je stimulovaná hexózamonofosfátovou dráhou. Pre tvorbu cyklických metabolitov je žiaduca vysoká dostupnosť kyslíka. Syntéza pigmentov rodom *Monascus* je pozitívne korelovaná s rastom mycélia a glukózovou limitáciou, negatívne sa viaže s nedostatočným transportom kyslíka.

Vplyv zloženia kultivačného média na produkciu pigmentov rodom *Monascus*

Na produkciu pigmentov významne vplyva zdroj dusíka. Často používané sú peptón a amónne ióny. V maltózo-amóniovej kultúre bolo produkované približne trikrát viac červených pigmentov ako v glukózo-amóniovej, kde sa prednostne produkovali žlté pigmenty. V glukózovej kultúre sa v médiu nahromadila veľká koncentrácia etanolu, pri maltóze len málo. Použitím peptónu sa u maltózy ešte zvýšila konečná koncentrácia biomasy a pigmentov, zatiaľ čo u glukózy sa prednostne produkoval etanol. Iniciácia respiro-fermentatívneho metabolizmu v submerznej aeróbnej kultúre *Monascus purpureus* s vysokou koncentráciou glukózy by mohla vysvetliť prítomnosť etanolu a nízky pozorovaný rastový výťažok. Pretože *Monascus purpureus* je neschopný anaeróbného rastu na glukóze a produkuje etanol aj za podmienok vysokej koncentrácie kyslíka, mohol by byť zaradený do kategórie Crabtree-negatívnych, respiráciou limitovaných mikroorganizmov [32].

Pre produkciu pigmentov rodom *Monascus* je potrebný dostatok glukózy a súčasne i prebytok dusíka pre tvorbu vodorozpustných pigmentov založených na inkorporácii aminodusíka do skeletu pigmentu a tým solubilizácii hydrofóbných reťazcov [33]. Existujú veľké rozpory v publikovaných prácach v súvislosti s najlepším uhlíkatým zdrojom pre produkciu červených pigmentov hubou *Monascus purpureus*. Okrem tradičných ryžových substrátov bolo navrhnuté veľké množstvo škrobnatých substrátov pre polosuchú i submerznú kultiváciu. Pre submerznú je to hlavne maltóza, rozpustný škrob a glukóza [25,34,35].

Vysoký prebytok glukózy vedie k produkcii etanolu pôsobiaceho inhibične na tvorbu pigmentov [36]. Hranica medzi produkciou pigmentov a tvorbou etanolu leží medzi 6-9 % hm. počiatočnej koncentrácie glukózy v médiu. Malé množstvá vytvoreného etanolu môžu byť spätne konvertované na pigment, čo naznačujú výsledky Wonga [37], ktorý pri statickej tekutej kultivácii zistil po 15 dňoch trojnásobnú produkciu biomasy a pigmentu pri počiatočnej koncentrácii glukózy 15 % oproti 4 % cukru. Časový priebeh tvorby biomasy nie je v práci popísaný.

Výsledky experimentov [32] potvrdzujú, že nízka koncentrácia glukózy vedie k veľkej produkcii biomasy, pri vysokej počiatkovej koncentrácii je produkovaný etanol a prevažne žlté pigmenty. Najväčšie množstvo pigmentov bolo naprodukovaných v médiu s udržiavanou hladinou glukózy do 20 g.l⁻¹.

Na koncentráciu glukózy v prostredí výrazne vplýva aktivita amylolytických enzýmov, najmä glukoamylázy, ktorá kulminuje okolo siedmeho dňa kultivácie na ryži [9,36,38]. Aktivita glukoamylázy je regulovaná počiatkovou vlhkosťou substrátu a prídavkami vody tak, aby koncentrácia glukózy v substráte nepresiahla 6 %, čo tvorí tajomstvo tradičnej polosuchej výroby farbív. K tomuto záveru vedú práce Iizuku [39], Pichayangura [40], Yasudu [9] Mentu [14], ktorí študovali aktivitu amylolytických enzýmov - amylázy, glukoamylázy a proteáz - Steinkrausa [41], Kittikuma [42], Nishikawu [43] a Lotonga [36]. Obídenním inhibíciou tvorby pigmentov glukózou je kultivácia na maltitole [44].

Pre ekonomiku produkcie pigmentov je dôležitá vysoká rýchlosť rastu a produkcie. Syntéza biomasy je ovplyvňovaná prítomnosťou organického alebo anorganického zdroja dusíka a vhodným pH. Optimálne pH pre rast je okolo 6,0, pri pH 4,0 dochádza k inhibícii, pri pH 2,5 je rast temer zastavený. Zároveň je známa závislosť medzi pH, množstvom a kvalitou pigmentu. Pre tvorbu červených pigmentov je optimálne pH 6,5, pre žlté pigmenty je to nižšie pH, okolo 4 [45]. Nízke pH favorizuje tvorbu monascorubrínu a rubropunctatínu oranžovej farby na úkor červených konjugovaných produktov s aminokyselinami a peptidmi či chitínom. Poznanie tejto závislosti viedlo k patentovej ochrane dvojstupňovej kultivácie pri pH vyššom ako 4 pre rast a pre pH nižšom ako 4 pre produkciu pigmentu [46,47]. Takto pripravený produkt je vhodný pre prípravu farbív definovaných štruktúr [13].

Počas kultivácie dochádza k samovoľnej alkalizácii média až na pH 8,0. Amónne soli ako zdroj dusíka svojou utilizáciou vedú k acidifikácii a tak predlžujú produkciu pigmentu. Aminokyseliny v médiu podporujú rast, na ich prítomnosti závisí rýchlosť alkalizácie, kvalita pigmentov i výťažku. Voľné aminokyseliny v médiu vyžadujú reguláciu pH, spôsobujú nárast rozpusteného pigmentu a zníženie celkového množstva vyprodukovaného pigmentu [33]. Optimálny pomer C/N je pre minerálne pôdy s amoniakálnym zdrojom dusíka v rozmedzí 1:100 až 1:200, kde pigment tvorí až 25 % sušiny mycélia [37].

Prídavok glutamátu, glycínu alebo leucínu k bunkám v stacionárnej fáze rastu vedie k tvorbe špecifických vodorozpustných červených pigmentov, zodpovedajúcich exogénnym aminokyselinám. Tieto pigmenty majú retenčné časy totožné s červenými derivátmi pripravenými chemicky z oranžových pigmentov v metanol-fosfátovom tlmivom roztoku pri pH 7 [48].

Vplyv mikroelementov

Praktický záujem o produkciu pigmentov rodom *Monascus* viedol k prekvapivo malému počtu prác zaoberajúcich sa kultiváciou na jednoduchých definovaných médiách.

Z minerálnych solí má značný význam zinok. Prítomnosť zinku v médiu inhibuje rast a zároveň stimuluje špecifickú produkciu pigmentov [49]. Optimálna koncentrácia zinku v podobe ZnSO_4 je pre tekuté médiá $0,035 \text{ mmol.l}^{-1}$ ($10 \text{ mg ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ v 1 dm^3 média). Železo je pre rast a produkciu pigmentov potrebné v stopových množstvách, za postačujúcu koncentráciu možno považovať $0,036 \text{ mmol.l}^{-1}$ ($10 \text{ mg FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ v 1 dm^3) [50]. Draslík nad koncentráciou $6,3 \text{ mmol.l}^{-1}$ nemá vplyv na rast a produkciu pigmentov, pri nižších hladinách je produkcia pigmentov znížená. Sodík sa v médiách spravidla nevyskytuje a ak, tak v malých množstvách, takže možno prepokladať, že jeho úloha pre produkciu pigmentov nie je dôležitá. Zaujímavý synergizmus bol pozorovaný pre ióny horčíka v kombinácii s fosforom. Nedostatok horčíka alebo fosforu inhibuje rast a tým i tvorbu pigmentov. Tradičné médiá sú spravidla limitované horčíkom pri prebytku fosforu, takže so zvyšovaním koncentrácie horčíka stúpa i celková produkcia pigmentov takmer lineárne, kým sa nedosiahne limitácia fosforom, zvýšením koncentrácie fosforu stúpa celková produkcia v závislosti na koncentrácii horčíka ďalej, kým sa nestane limitujúcim uhlík alebo dusík. Optimálnou kombináciou je $32 \text{ mmol.l}^{-1} \text{ MgSO}_4$ a 31 mmol.l^{-1} fosfátov, alebo prebytok jedného z týchto dvoch prvkov pri zachovaní doporučenej koncentrácie druhého [50].

Vplyv kyslíka

Parciálny tlak kyslíka a oxidu uhličitého výrazne ovplyvňujú produkciu pigmentov, menej výrazne je ovplyvnený i rast. *Monascus purpureus* poskytuje maximálny výťažok pigmentov počas SSF kultivácie na ryži v uzavretých priestoroch pri $p\text{O}_2$ blízke $0,05 \text{ MPa}$, čo je viac než dvojnásobok atmosférického tlaku. Vysoká koncentrácia CO_2 inhibuje produkciu pigmentov, kompletná inhibícia nastáva pri $p\text{CO}_2 = 0,1 \text{ MPa}$. Pri $p\text{O}_2 = 0,05 \text{ MPa}$ a $p\text{CO}_2 = 0,02 \text{ MPa}$ bol zaznamenaný najvyšší výťažok pigmentu [51].

Nadprodukcia pigmentov rodom *Monascus*

Hydrofóbná povaha pigmentov znamená, že väčšina pigmentov je viazaná v mycéliu. Úspešné postupy v zvýšení produktivity spočívajú v ovplyvnení transportu intracelulárnych pigmentov do média:

- a) prídavkom solubilizujúcich látok tvoriacich s pigmentami vodorozpustný komplex (aminokyseliny, glutamát sodný, chitín [33,50]),
- b) zvýšením permeability bunky prídavkom neiónových detergentov alebo rastlinných olejov [52],
- c) mutačným zvýšením permeability bunkovej steny - stimulácia excízie vnútrobunkového obsahu,
- d) selektívnymi inhibičnými prekursorami tvorby pigmentov [53],
- e) vhodnou dĺžkou kultivácie zahrňujúcou čiastočnú autolýzu buniek.

Bola patentovaná produkcia kryštalických pigmentov submerznou kultiváciou rodu *Monascus* pomocou induktorov ako sú Tween 20, 40, 60, 80 a rôzne rastlinné oleje [52].

Výsledky publikovaných experimentov ukazujú, že na zlepšenie výťažku pigmentov môžu byť použité rôzne druhy mutagénov: z fyzikálnych je to UV svetlo [54], gama lúče, z chemických N-metyl-N-nitrózoguanidín a etylmetanosulfonát. Najlepšia stabilita mutantov bola pozorovaná pri ožarovaní UV svetlom. Optimálna expozícia na zvýšenie výťažku žltého pigmentu oproti rodičovskému kmeňu bola 20 minút. Porovnaním spektier bolo zistené, že zatiaľ čo rodičovský kmeň má dve absorpčné maximá pri 420 a 500 nm, mutant má len jedno maximum pri 370 nm. Znamená to zmenu farby z červenej na žltú [5].

Úspešné boli izolácie hyperproduktívnych mutantov indukovanou mutáciou N-metyl-N-nitro-N-nitrózoguanidínom alebo RTG žiarením [13,37].

Porovnanie polosuhej a submerznej produkcie pigmentov rodom *Monascus*

Tradičným spôsobom produkcie pigmentov vláknitými hubami rodu *Monascus* je polosuchá fermentácia na ryži. Na rozhraní polosuhej a submerznej kultivácie stojí rolerový postup produkcie v tekutej pôde prinášajúci zlepšenie v objemovej produktivite blízkej SSF procesu [55].

Pokusy o adsorbciu pigmentov pomocou polymérnych živíc skončili neúspešne [49]. Pri kultivácii na hydrogélach - upútaná kultivácia, kde sa prejavuje limitácia transportu látky, prídavok adsorbentu znižoval inhibíciu

produktom a zvyšoval maximálny výťažok pigmentu [56]. Zvýšenie produkcie pigmentov je dôsledkom zmeny fyziologického stavu kultúry imobilizáciou a tým jej priblížením podmienkam SSF. Podobné závery možno urobiť z experimentov Maka [55] z rolerovej kultivácie na tekutých pôdach. Za optimálnych podmienok (2 rpm, 28 °C), vzrastá množstvo červených pigmentov 10-násobne, t.j. na úroveň polosuchej produkcie. Rolerová kultivácia na tekutej pôde sa tak blíži k upútanému rastu na stenách fľaše s periodickým zmáčaním živným roztokom.

Úsilie o submerznú produkciu naráža na mnoho komplikácií: biologický cyklus vláknitej huby, regulovaná nízka koncentrácia glukózy, potreba aminokyselín v médiu a ich regulácia, pôsobenie strižných síl v konflikte s náročnosťou na prestup kyslíka i pomerne dlhá doba aseptickkej kultivácie. Správy o celkových produktivitách tvorby pigmentov viac než 150 J500.cm⁻³ dosiahnutých submerznou produkciou sú vzácné, pričom dĺžka kultivácie spravidla presahuje 7 dní. Výťažok biomasy býva nízky. Zaujímavým momentom je prepočet objemovej produktivity tvorby pigmentov na gram suchej biomasy, kde sa úroveň blíži polosuchým kultiváciám. Na sfarbenie a farebné jednotky významne vplýva použité extrakčné činidlo [57].

Celková i objemová produkcia pigmentov kultúrami rodu *Monascus* pri polosuchej kultivácii je o jeden rád vyššia než na tekutých pôdach. Komerčne dostupné preparáty obsahujú viac ako 500 J500 červených pigmentov na gram sušiny [48], niekedy dokonca 2000 J500.g⁻¹, čisté mycélium s pigmentom môže obsahovať vyše 5000 J v grame sušiny [50]. Dĺžka kultivácie býva okolo 14 dní, no s nižšími nákladmi na homogenizáciu a aeráciu než u submerzných procesov. Limitujúcim činiteľom pre priemyselnú polosuchú produkciu je dosiaľ neuspokojivo riešený odvod metabolického tepla.

Cena dovážaných preparátov „červenej ryže“ je od 200 Sk/kg bez garantovanie farebnej mohutnosti (okolo 500 J.g⁻¹). Ide o prípravky na báze polosuchej kultivácie. Čistý pigment v kryštalickom stave by mal ekvivalentnú farebnú mohutnosť okolo 25000 J.g⁻¹.

Z uvedeného je vidieť, prečo sa dosiaľ neuplatnila submerzná produkcia pigmentov napriek množstvu štúdií jej venovaných a patentovo chránených postupov [13,44,46,47,52].

Perspektívy aplikácie monaskových pigmentov

Prírodné pigmenty s absorpčným maximom v červenej oblasti spektra sú vysoko žiadané. Popri rastlinných farbivách, ktorých aplikácie sú limitované termostabilitou a pH stabilitou, jedinou alternatívou farbivám syntetickým

sú len pigmenty produkované mikrobiálne metódami biotechnológií. Potenciál pigmentov rodu *Monascus* zahŕňa od farbenia rastlinných proteínov, cez mäsové a mliečne výrobky až po alkohol obsahujúce nápoje.

WHO/FAO nezaujalo dosiaľ oficiálne schvaľujúce stanovisko k aplikácii farbív produkovaných vláknitými hubami rodu *Monascus* do potravinárskych výrobkov. Nezískali ani GRAS štatút USFDA, a tak ich aplikácia musí byť schválená v súlade s §150 tretej hlavy druhej časti pripravovaného Potravinového kódexu SR.

Všeobecnému rozšíreniu monaskových pigmentov dosiaľ bráni ich vyššia cena a riziká spojené s možnou prítomnosťou bioaktívnych sekundárnych metabolitov v komerčne dovezených preparátoch. Riešením oboch problémov je domáca výroba. Slovensko má rozvinutý fermentačný priemysel, výrobné kapacity i ľudský potenciál v oblasti mikrobiálnych výrob. Výroba v kontrolovaných domácich podmienkach môže zabezpečiť ako hygienické požiadavky, tak i cenovú primeranosť pre náročné potravinárske aplikácie. Samozrejmosťou by mal byť prepracovaný spôsob izolácie a derivatizácie prispôsobujúci pigmenty konkrétnym aplikáciám.

Predbežné výsledky naznačujú, že sa podarí splniť kritériá cenovej efektívnosti produkcie u polosuchých, ale i submerzných a upútaných procesov. Po overení produktivity v poloprevádzkovom rozsahu, zabezpečení hygienických požiadaviek a legislatívnom konaní očakáva monaskové pigmenty budúcnosť rovnako ružová ako farba produktov ich obsahujúcich.

Zoznam použitých skratiek:

J	jednotka farebnosti pigmentov (1 J je definovaná ako množstvo pigmentu, ktoré pri danej vlnovej dĺžke v roztoku má absorbanciu 1,0 v 1 cm kvete. J sú prepočítané na 1 cm ³ roztoku alebo 1 g suchého substrátu.)
J400	absorbancia pigmentu v J pri $\lambda = 400$ nm
J500	absorbancia pigmentu v J pri $\lambda = 500$ nm
SSF	polosuchá fermentácia

Slovníček cudzích slov:

ankak	ryža prerastená červeným mycéliom <i>Monascus</i> sp.
koji	vegetatívne ryžové inokulum = ryža obrastená mycéliom
tofu	sójový syr
tofu	sójový syr zretý v láku
awamori	surový destilát z ryžového vína

Táto práca vznikla s príspevím grantov VEGA 95/5195/199 a VEGA 1/4201/97.

Literatúra

1. JÜZLOVÁ, P. - MARTÍNKOVÁ, L. - UJCOVÁ, E.: Produkce přírodních barviv houbou *Monascus* sp. 1. Vliv kultivačních podmínek na tvorbu barviv. Kvasný prům., 37, 1991, č. 7, s. 199-203.
2. FIELDING, B. C. - HOLKER, J. S. E. - JONES, D. F. a kol.: The chemistry of fungi. The structure of monascin. J. chem. Soc., 898, 1961, č. 39, s. 4579-4585.
3. OBER, P. - KUNZ, B.: Wirkung von Stoffwechselprodukten des *Monascus purpureus* auf Bakterien. Fleischwirtschaft, 69, 1989, č. 1, s. 123-125.
4. JÜZLOVÁ, P. - MARTÍNKOVÁ, L. - LOZINSKI, J. - MACHEK, F.: Ethanol as substrate for pigment production by the fungus *Monascus purpureus*. Enzyme microb. Technol., 16, 1994, č. 11, s. 996-1001.
5. YONGSMITH, B. - KRAIKRAK, S. - BAVAVODA, R.: Production of yellow pigments in submerged culture of a mutant of *Monascus* spp. J. Ferment. Bioengng, 78, 1994, č. 3, s. 223-228.
6. BELL, R. J. - WHITE, B.: The potential of biotechnology for the production of flavors and colours for the food industry. Int. ind. Biotechnol., 9, 1989, č. 3, s. 20-26.
7. FRANCIS, F. J.: Lesser-known food colorants. Food Technol., 62, 1987, č. 4, s. 62-68.
8. Pat. US 5013564. UOP, Des Plaines, Illinois. ST MARTIN, E. J. - KUREK, P. R. - SCHUMACHER, E. F. - ROHRBACH, R. P.: Reduced *Monascus* pigment derivatives as yellow food colorants. 3.8.1990.
9. YASUDA, M. - KOBAYASHI, A.: Preparation and characterization of tofuyo. In: Trends in food biotechnology. Ghee, A. H., Singapore 1989. s. 82-96.
10. CHUON, C. H.: Studies on the liquid red koji. A. Rep. (Taiwan Tob. Wine Mon. B.), 11, 1960, s. 1-14.
11. FINK-GREMMEIS, J. - DRESEL, J. - LEISTNER, L.: Use of *Monascus* extracts as an alternative to nitrite in meat products. Fleischwirtschaft, 71, 1991, č. 10, s. 1184-1186.
12. FINK-GREMMEIS, J. - GLENN, E. - LEISTNER, L.: *Monascus* extracts: an alternative to nitrite and nitrate in sausages? (*Monascus*-extrakte: eine alternative zum nitrit/nitrat bei wurstwaren?) Mitt.-Bl. BAFF, 28, 1989, č. 105, s. 325-329.
13. Pat. US 3993789. Societe d'assistance technique pour produits Nestle S.A. Lausanne. MOLL, H. R. - FARR, D. R.: Red pigment and process. 23.11.1976.
14. MENTA, S.: Produkcia pigmentov hubou *Monascus* sp. [Diplomová práca.] Bratislava 1992. 90 s. - Slovenská technická univerzita. Chemickotechnologická fakulta.
15. Pat. JP 02303477. MATSUNAGA, M.: *Monascus* for manufacture of fruit vinegar. 1990.
16. KRANZ, CH. - PANITZ, C. - KUNZ, B.: Biotransformation of free fatty acids in mixtures to methyl ketones by *Monascus purpureus*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 36, 1992, č. 4, s. 436-439.
17. JÜZLOVÁ, P. - ŘEZANKA, T. - MARTÍNKOVÁ, L. - KŘEN, V.: Long-chain fatty acids from *Monascus purpureus*. Phytochemistry, 43, 1996, č. 1, s. 151-153.
18. WONG, H. C. - KOEHLER, P. E.: Mutant for *Monascus* pigment production. J. Food Sci., 46, 1981, č. 5, s. 956-957.
19. WONG, H. C. - BAU, Y. S.: Pigmentation and antibacterial activity of fast-neutron and X-ray induced strains of *Monascus purpureus*. Went. Pl. Physiol., 60, 1977, s. 578.
20. KAIO, K. - NIWAYASAMA, S. - NITAHARA, Y. - MIYAMURA, S.: Toxicity of *Monascus* pigment. Nigata Igakkai Zasshi, 92, 1978, s. 815.
21. ENDO, A.: Monakolin K, a new hypercholesterinemic agent that specially inhibits 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. J. Antibiot., 33, 1980, č. 3, s. 334-337.

22. KIMURA, K. - KOMAGATA, D. - MURAKAWA, S. - ENDO, A.: Biosynthesis of monakolins: conversion of monakolin J to monakolin K. *J. Antibiot.*, 43, 1990, č. 12, s. 1621-1625.
23. NAMAKURA, T. - KOMAGATA, D. - MURAKAWA, S. - ENDO, A.: Isolation and biosynthesis of 3- α -hydroxy-3,5-dihydro- monakolin L. *J. Antibiot.*, 43, 1990, č. 12, s. 1597-1600.
24. BLANC, P. J. - LAUSSAC, J. P. - LE BARS, J. - LE BARS, P. - LORET, M. O. - PAREILLEUX, A. - PROMÉ, D. - PROMÉ, J. C. - SANTERRE, A. L. - GOMA, G.: Characterization of monascidin A from *Monascus* as citrinin. *Int. J. Food Microbiol.*, 27, 1995, č. 2-3, s. 201-213.
25. BLANC, P. J. - LORET, M. O. - GOMA, G.: Production of citrinin by various species of *Monascus*. *Biotechnol. Lett.*, 17, 1995, č. 3, s. 291-294.
26. MARTÍNKOVÁ, L. - JÜZLOVÁ, P. - VESELÝ, D.: Biological activity of polyketide pigments produced by the fungus *Monascus*. *J. appl. Bacteriol.*, 79, 1995, č. 6, s. 609-616.
27. JÜZLOVÁ, P. - MARTÍNKOVÁ, L. - KŘEN, V.: Secondary metabolites of the fungus *Monascus*: A review. *J. ind. Microbiol.*, 16, 1996, č. 3, s. 163-170.
28. NOZAKI, H. - DATE, S. - KONDO, H. a kol.: Ankalactone, a new α,β -unsaturated γ -lactone from *Monascus anka*. *Agric. biol. Chem.*, 55, 1990, č. 3, s. 899-900.
29. BLANC, P. J. - LORET, M. O. - SANTERRE, A. L. - PAREILLEUX, A. - PROMÉ, D. - PROMÉ, J. C. - LAUSSAC, J. P. - GOMA, G.: Pigments of *Monascus*. *J. Food Sci.*, 59, 1994, č. 4, s. 862-865.
30. LEISTNER, L. - ECKARDT, C.: Vorkommen toxigener *Penicillium* bei Fleischerzeugnissen. *Fleischwirtschaft*, 59, 1979, č. 12, s. 1892-1896.
31. LEISTNER, L.: Mould fermented foods: recent developments. *Food Biotechnol.*, 4, 1990, č. 1, s. 433-441.
32. CHEN, M. H. - JOHNS, M. R.: Effect of carbon source on ethanol and pigment production by *Monascus purpureus*. *Enzyme microb. Technol.*, 16, 1994, č. 7, s. 584-590.
33. CARRELS, M. - SHEPERD, D.: The effect of pH and amino acids on conidiation and pigment production of *Monascus major* ATCC 16362 and *M. rubiginosus* ATCC 16367 in submerged shaken culture. *Can. J. Microbiol.*, 24, 1978, č. 10, s. 1346-1357.
34. LIN, C. F. - IIZUKA, H.: Production of extracellular pigment by a mutant of *Monascus kaoliang* sp. nov. *Appl. env. Microbiol.*, 43, 1982, č. 3, s. 671-676.
35. YOSHIMURA, M. - YAMANAKA, S. - MITSUGI, K. - HIROSE, Y.: Production of *Monascus* pigment in a submerged culture. *Agric. biol. Chem.*, 39, 1975, č. 9, s. 1789-1795.
36. LOTONG, N. - SUWANARIT, P.: Fermentation of ang-kak in plastic bags and regulation of pigmentation by initial moisture content. *J. appl. Bact.*, 68, 1990, s. 565-570.
37. WONG, H. C. - LIN, Y. C. - KOEHLER, P. E.: Regulation of growth and pigmentation of *Monascus purpureus* by carbon and nitrogen concentrations. *Mycologia*, 73, 1981, s. 649-654.
38. YASUDA, M. - KUWAE, M. - MATSUSHITA, H.: Purification and properties of two forms of glucoamylase from *Monascus* sp. No. 3403. *Agric. biol. Chem.*, 53, 1989, č. 1, s. 247-249.
39. IIZUKA, H. - MINEKI, S.: Studies on the genus *Monascus*. I. Purification and properties of two form of glucoamylase from *Monascus kaoliang* F-1. *J. gen. appl. Microbiol. (Tokyo)*, 23, 1977, s. 217-230.
40. PICHAYANGURA, S.: Effect of nutrition on amylase production by *Monascus purpureus*. *J. Sci. Soc. Thailand*, 5, 1979, s. 175-184.
41. Handbook of indigenous fermented foods. Ed. K. H. STEINKRAUS - R. E. CULLEN - C. S. PEDERSON - L. F. NELLIS - B. K. GAVITT. New York, Marcel Dekker 1983. 671 s.
42. KITIKUM, H. - CHAREN, V. - PINTHONG, R.: Factors affecting red rice production by *Monascus purpureus*. *J. Agric.*, 4, 1988, s. 122-132.
43. NISHIKAWA, J. - WATANABE, Y. - KASHIMURA, J. - ASO, K. - IIZUKA, H.: Characterization of extracellular proteinases of the genus *Monascus* by their pH activity profiles. *J. gen. appl. Microbiol. (Tokyo)*, 34, 1988, č. 6, s. 467-474.

44. Pat. US 4442209. Kabushiki Kaisha Hayashibara Seibutsu Kagaku Kenkyuo, Okayama. MYIAKE, T. - OHNO, S. - SAKAI, S.: Process for the production of *Monascus* pigment. 10.4.1984.
45. CHEN, M. H. - JOHNS, M. R.: Effects of pH and nitrogen source on pigment production by *Monascus purpureus*. Appl. Microb. Biotechnol., 40, 1993, č. 1, s. 132-138.
46. Pat. CH 606421. Société des Produits, Nestlé S.A., Vevey. SHEPHERD, D. - CARELS, M. C.: Procédé de production d'un pigment de „*Monascus*“. 2.6.1976.
47. Pat. US 4145254. Societe d'assistance technique pour produits Netle S.A., La Toure de Teilz. SHEPHERD, D. - CARELS, M. C.: Red pigments production. 20.3.1979.
48. BRODER, C. U. - KOEHLER, P. E.: Pigments produced by *Monascus purpureus* with regard to quality a quantity. J. Food Sci., 45, 1980, č. 3, s. 567-569.
49. BAU, Y. S. - WONG, H. C.: Zinc effects on growth, pigmentation and antibacterial activity of *Monascus purpureus*. Physiol. Plant., 46, 1979, č. 1, s. 63-67.
50. LIN, T. F. - DEMAİN, A. L.: Effect of nutrition of *Monascus* sp. on formation of red pigments. Appl. Microbiol. Biotechnol., 36, 1991, č. 1, s. 70-75.
51. HAN, O. - MUDGETT, R. E.: Effects of oxygen and carbon dioxide partial pressures on *Monascus* growth and pigment production in SSF. Biotechnol. Progr., 8, 1991, č. 1, s. 5-10.
52. Pat. US 4927760. UOP, Des Plaines, Illinois. ST MARTIN, E. J.: Production crystalline pigment from *Monascus* during fermentation. 22.5.1990.
53. HONG, Y. J. - KIM, J. C. - WOO, H. C. - KIM, S. U.: Effects of feeding intermediate and starter units on *Monascus* pigments production. Agric. Chem. Biotechnol., 38, 1995, č. 1, s. 31-36.
54. MOGOŇOVÁ, E.: Regulácia syntézy pigmentov rodom *Monascus*. [Diplomová práca.] Bratislava 1995. 65 s. - Slovenská technická univerzita. Chemickotechnologická fakulta.
55. MAK, N. K. - FONG, W. F. - WONG-LEUNG, Y. L.: Improved fermentative production of *Monascus* pigments in roller bottle culture. Enzyme microb. Technol., 12, 1990, č. 12, s. 965-968.
56. EVANS, P. J. - WANG, H. Y.: Pigment production from immobilized *Monascus* sp. utilizing polymeric resin adsorption. Appl. envir. Microbiol., 47, 1984, č. 6, s. 1323-1326.
57. JÜZLOVÁ, P. - MARTÍŇKOVÁ, L. - SEICHERT, L.: Produkce přírodních barviv houbou *Monascus*. II. Extrakce pigmentů z mycelia a jejich stabilita. Kvasný prům., 38, 1992, č. 8, s. 240-242.

Do redakcie došlo 22.7.1997.

Microbial production of the monascus pigments and their food applications

SLUGEN, D. - ŠTURDÍKOVÁ, M. - ROSENBERG, M.: Bull. potrav. Výsk., 36, 1997, p. 155-169

SUMMARY. Actual knowledge of the microbial production of the pigments by filamentous fungi of *Monascus* sp. are reviewed. The paper discusses substrate regulated basis of pigment production and the potential fields of food applications of such products. Special interest is devoted to the application possibilities of the monascus pigments from the view of hygienic a toxicological aspects as they could be considered as new additives with the unfinished legislative. Yields, volume productivity and price of the solid state cultivation prepared pigments clearly dominated over the submerged process. Advantages and disadvantages of both cultivation regimes are compared.