

# Produkce přírodních barviv houbou *Monascus species*

579

## 1. Vliv kultivačních podmínek na tvorbu barviv

Ing. PETRA JŮZLOVÁ, Ing. LUDMILA MARTÍNKOVÁ, CSc., RNDr. EMMA UJCOVÁ, CSc., Mikrobiologický ústav ČSAV, Praha.

**Klíčová slova:** *Monascus*, barviva, kultivace, extrakce, škrobové substráty

## ÚVOD

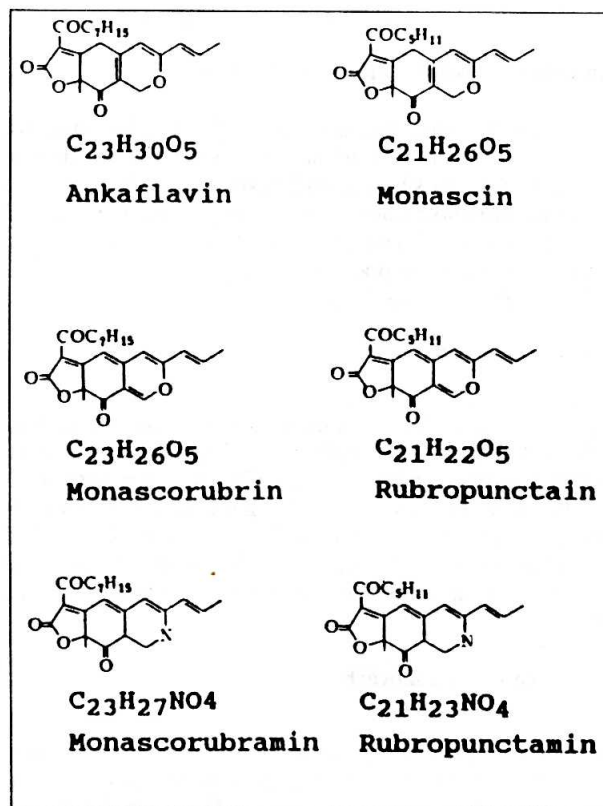
Použití houby rodu *Monascus* pro barvení potravin je v Orientu známo již velmi dlouho [1]. Tato houba v závislosti na kmenu a podmínkách kultivace produkuje větší či menší množství žlutých, oranžových a červených barviv. V literatuře je popsáno barvení rybích pokrmů, sýrů, alkoholických nápojů a zejména rýže [1, 2]. Práškem, získaným rozemletím zfermentované rýže, je možno barvit přímo, bez extrakce [1]. Patentově chráněný je způsob výroby tablet, kterými lze barvit potraviny [3]. Výhodné by bylo nahradit červeným barvivem houby *Monascus* dosud používané a ze zdravotního hlediska ne právě nejvhodnější nitráty a nitrity při barvení masných výrobků. Tato možnost je diskutována v článku [4].

Houba *Monascus* patří do třídy *Ascomycetes*, čeledi *Aspergillaceae*. Rozmnožuje se asexuálním i sexuálním způsobem. Úplný sexuální cyklus je možno pozorovat jak při povrchové, tak při submerzní kultivaci [5].

Pro tvorbu pigmentů jsou nejlepší média, která obsahují škrob jako zdroj uhlíku [6, 7, 8]. Pigmenty jsou sekundárními metabolity a k jejich tvorbě dochází, jestliže růst je limitován dusíkem nebo fosforem a látková přeměna glukosy se děje vedle glykolýzy i pentosovým cyklem [7]. Pigmenty jsou polyketidového charakteru [9, 10] (obr. 1) a tvoří se v cytoplasmě. K jejich extracelulárnímu vylučování dochází až u staršího mycelia. Pokud jde o zdroj dusíku, pro růst jsou optimální organické zdroje, avšak pro tvorbu pigmentů anorganické [11]. Dusík je zvláště důležitý pro tvorbu červených pigmentů, protože jejich červené zbarvení je způsobeno dusíkem, zabudovaným v hlavním řetězci. Žluté a oranžové pigmenty ve své molekule dusík neobsahují. Přeměnu oranžového pigmentu na červený třepáním oranžového pigmentu ve zředěném roztoku amoniaku popisuje Haws a kol. [12]. Dalším důležitým faktorem, který ovlivňuje tvorbu barviv, je pH média [13]. Sledován byl také vliv aminokyselin v médiu na tvorbu pigmentů [13, 14]. Produkci pigmentů dále ovlivňuje intenzita aerace a kultivační teplota; optimální teplota pro tvorbu pigmentů je 30 °C [6, 7].

Tradičním způsobem kultivace houby *Monascus* je již zmíněná fermentace rýže, tedy povrchová fermentace. Obecně se předpokládalo, že při tomto způsobu fermentace se dosáhne vyšších výtěžků pigmentu než při fermentaci submerzní. Proto byl učiněn pokus o napodobení povrchové fermentace kultivací s imobilizovanými buňkami [15], avšak výsledky nebyly uspokojivé. Lepších výsledků bylo dosaženo při submerzní kultivaci s přidávkou adsorpční pryskyřice do tekutého média [15, 16]. Ovšem při zajištění dostatečného vzdušného (třepáním, vhodným plněním), při vhodném složení média, pH a teplotě (viz výše) je submerzní fermentace úspěšná [6, 7, 17].

Jednotlivé publikované práce se v názoru na optimální kultivační podmínky značně rozcházejí. Pravděpodobně velkou roli hraje výběr kmene. Byly také popsány úspěšné



Obr. 1. Struktura barviv houby *Monascus* (podle Obera a Kunze, 1989, [7])

pokusy o izolaci hyperproduktivních mutantů mutací, indukovanou N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidinem [18] nebo rentgenovým zářením [19].

Rod *Monascus* je zajímavý nejen z hlediska produkce barviv, ale byla u něj pozorována i produkce antibiotik [4, 20], amylolytických enzymů [21, 22], proteolytických enzymů [23] a monakolinu [24, 25, 26], inhibitoru 3-hydroxy-3-methyl-glutarylkoenzym A reduktasy, klíčového enzymu v syntéze cholesterolu. Zajímavé je i složení mastných kyselin u tohoto rodu [27].

## MATERIÁL A METODY

**Mikroorganismus a jeho uchovávání:** *Monascus* sp. ze sbírky MBÚ ČSAV byl uchováván na šikmých sladinných agarrech a přeočkováván jednou za 2 měsíce. Kultivace kultury na šikmém sladinném agaru probíhala 11 dní při 30 °C.

**Kultivační média:**

**Produkční médium (6):** kukuřičný škrob (Škrobárny Havlíčkův Brod, odd. Červená Řečice) 3 %; NaNO<sub>3</sub> 0,15 %,



$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  0,1 %,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,25 %, vodovodní voda. **Sladinový agar:** Sladina ředěná vodovodní vodou na koncentraci extraktu 7,5–8 %, agar 2 %.

**Czapek-Doxův agar:** glukosa 2 %,  $\text{NaNO}_3$  0,2 %, KCl 0,05 %,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1 %,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  0,05 %,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  0,001 %, agar 2 %, destilovaná voda.

**Sabouraudův agar:** glukosa 4 %, pepton 1 %, agar 2 %, destilovaná voda.

**Škrobový agar:** pepton 0,5 %, rozpustný škrob 2 %, kyselý hydrolyzát kaseinu 0,2 %, kvasničný extrakt 0,1 %, agar 2 %.

Všechny půdy byly sterilovány 45 minut při 115 °C.

### Kultivace v tekutém médiu se škrobem

50 ml produkčního média v 250–300 ml Erlenmayerově baňce bylo očkováno 1 ml suspenze spor získané smytím spor z kultury na šikmém sladinovém agaru 3 ml 0,06 % chloridu sodného a kultivováno na třepačce (amplituda 23 mm, frekvence 3,7 Hz) při 30 °C. Není-li uvedeno jinak, nebylo pH média na počátku kultivace upravováno a rovnalo se 4,8–5,0 po sterilaci.

### Kultivace na rýži

Rýže byla propláchnuta studenou a pak horkou vodou. 300 ml Erlenmayerovy baňky byly naplněny 100 g rýže. Sterilizace byla prováděna při 120 °C 30 minut dvakrát v intervalu 24 h. Rýže byla očkována 2 ml suspenze spor (příprava suspenze viz výše) a inkubována při 30 °C ve vlhké komůrce. Během kultivace (3.–4. den) byla rýže zvlhčena 2–4 ml sterilní vody. Kultivace byla skončena po 7–10 dnech.

### Kultivace na bramborech

Kousky oloupaného bramboru byly sterilovány ve zkumavkách 30 minut při 120 °C a zaočkovány 0,5 ml suspenze spor. Kultivace probíhala při 30 °C ve vlhké komůrce 5 dní. Brambory byly extrahovány podobně jako rýže.

### Kultivace na ztužených médiích

Plotny se ztuženými médii (Czapek-Doxův agar, sladinový agar, škrobový agar s peptonem) byly očkovány kulturou ze šikmého sladinového agaru (vpichem, 3 kolonie na 1 plotnu) a inkubovány při 30 °C.

### Stanovení barviv a sušiny

Obsah baňky byl po skončení kultivace zfiltrován přes předem vysušený a zvážený filtrační papír a filtrát proměřen spektrofotometricky proti destilované vodě při 405 nm, kdy vykazoval nejvyšší absorbanci. Filtrační koláč byl extrahován 50 ml směsí 0,9 % NaCl a 96 % ethanolu [11] nebo ředěným ethanolom. Není-li uvedeno jinak, byla použita extrakční směs o výsledné koncentraci ethanolu 50 %. Extrakt byl spektrofotometricky proměřen proti extrakční směsi při 405 nm a 510 nm, protože při těchto vlnových délkách vykazoval nejvyšší hodnoty absorbance. Vzorky byly v případě potřeby ředěny destilovanou vodou (filtrát) nebo extrakční směsí (extrakt). Intenzita zbarvení vzorku je udávána jako hodnota jeho absorbance ( $A_\lambda$ ) s ohledem na jeho ředění ( $f$ ), (intenzita zbarvení  $[j.] = A_\lambda \cdot f$ ). Sušina byla stanovena vážkově.

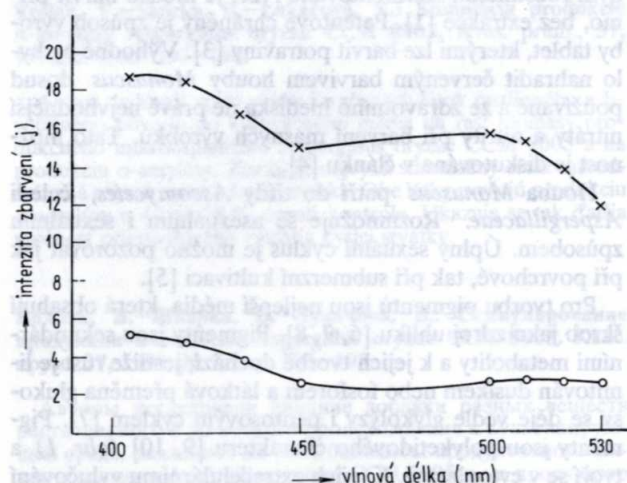
Fermentovaná rýže byla rozemleta. 0,5 g mleté rýže bylo extrahováno 10 ml extrakční směsí v 25 ml Erlenmayerově baňce na reciproké třepačce (amplituda 3 cm, frekvence 1 Hz). Po zfiltrování byla změřena absorbance roztoku při 405 nm a 510 nm.

## VÝSLEDKY A DISKUSE

### Vliv kultivačních podmínek na produkci barviva

#### 1. Stacionární kultivace na rýži a bramborech

Vedle rýže, která je vyzkoušena jako vhodný substrát pro produkci barviv, byla úspěšná i kultivace na bramborech. Pigmenty ze stejných množství obou homogenizovaných fermentovaných substrátů byly extrahovány stejným objemem extrakční směsi. Hodnoty absorbance obou extraktů při různých vlnových délkách jsou uvedeny na obr. 2. U obou křivek jsou patrná dvě absorpční maxima;



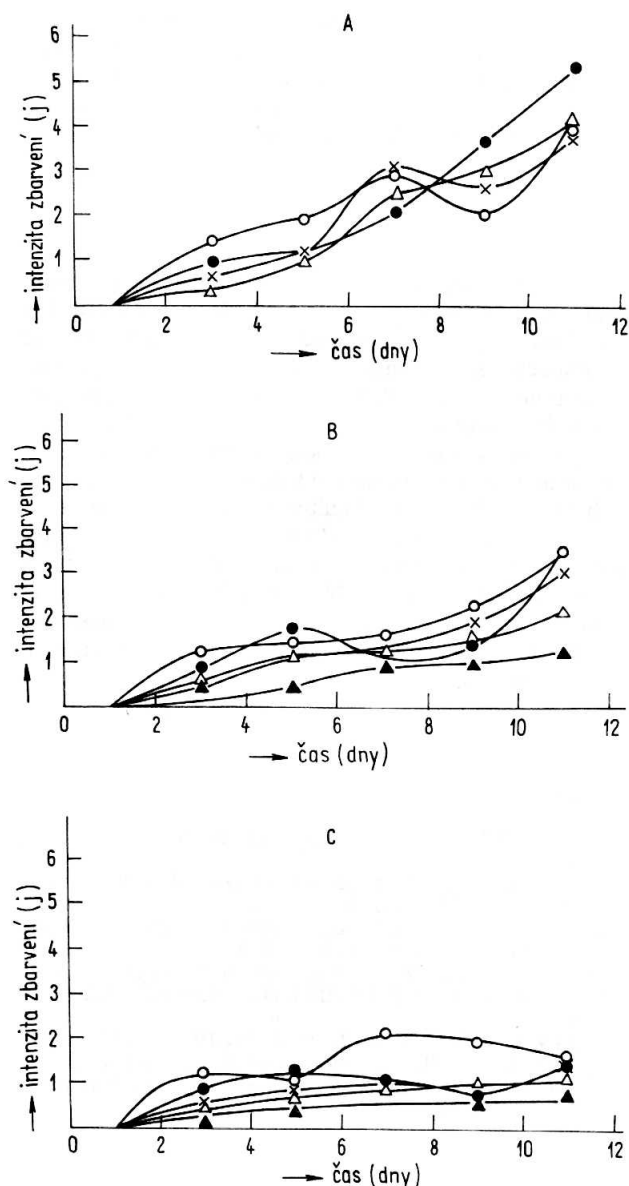
Obr. 2. Absorbance extraktů z homogenizované fermentované rýže a brambor při různých vlnových délkách (rýže —x—, brambory —o—)

jedno kolem vlnové délky 400 nm, což odpovídá žlutým barvivům, druhé kolem vlnové délky 500 nm, což odpovídá červeným barvivům. Intenzita zbarvení extraktu z rýže je zhruba 3,5krát větší než intenzita zbarvení extraktu z brambor. To ovšem nemusí znamenat, že by brambory byly horším substrátem. Je třeba vzít v úvahu specifický povrch (velikost povrchu na jednotku hmotnosti) rýže ve srovnání s menším specifickým povrchem relativně velkých bramborových kostiček. Tento fakt je důležitý, protože houba *Monascus* má velké nároky na zásobování kyslíkem (viz dále). Rozdílné výsledky mohou být také způsobeny nestejným obsahem a kvalitou škrobu v obou substrátech.

#### 2. Submerzní třepaná kultivace v tekutém produkčním médiu

Filtrát kultivačního média po odstranění mycelia vykazoval absorpční maximum pouze při 405 nm, extrakt získaný promytím filtračního koláče extrakční směsí při 405 nm a 510 nm. 405 nm odpovídá žlutému pigmentu, 510 nm červenému. Typický průběh kultivace ukazuje obr. 3 (křivky odpovídající pH 5).





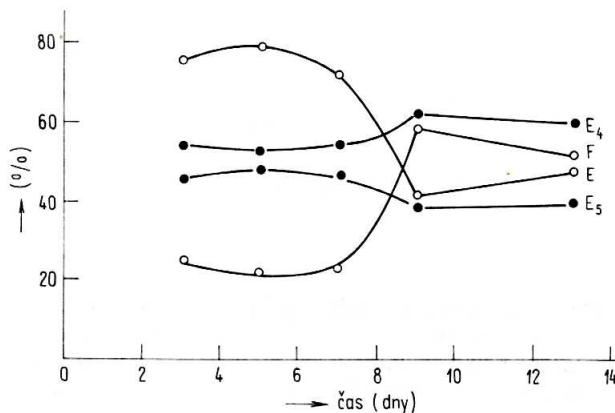
Obr. 3. A–C. Změny absorbance filtrátu kultivačního média při 405 nm (A) a extraktu z buněk při 405 nm (B) a 510 nm (C) v průběhu kultivace v závislosti na počátečním pH média x – pH 4, o – pH 5, ● – pH 6, △ – pH 7, ▲ – pH 8

Intenzita zbarvení filtrátu média i extraktu je popsáným způsobem měřitelná až od třetího dne kultivace vzhledem k zákalu, který je způsoben nespotřebovaným škrobem. Koncentraci biomasy jsme ze stejného důvodu, tj. kvůli tomu, že nespotřebovaný škrob tvoří zrna, která zůstávají ve filtračním koláči spolu s myceliem, během kultivace nesledovali. Stanovili jsme pouze konečnou hodnotu koncentrace biomasy.

Během fermentace se mění poměrné zastoupení pigmentů v extraktu a filtrátu. Na začátku kultivace je pigment obsažen hlavně v extraktu, tj. zůstává v buňkách (v množství okolo 80 %), zatímco od 8. až 10. dne kultivace je poměr koncentrací pigmentu v myceliu a v médiu zhruba 1 : 1, tedy 50 % pigmentů se uvolní do média, pravděpodobně vlivem částečné lýzy buněk. Poměr množství červených pigmentů ke žlutým se během fermentace výrazně nemění. Všechny tyto skutečnosti dokumentuje obr. 4.

### 3. Stacionární kultivace v tekutém produkčním médiu

Při tomto způsobu kultivace se slabé oranžové zbarvení v baňkách objevilo až po 72 h. Po 13denní kultivaci ještě zdaleka nebyl spotřebován všechn škrob a oranžovočervené zbarvení média nebylo příliš intenzivní: Hodnoty absorbance filtrátu i extraktu byly více než desetkrát nižší než hodnoty získané po 7denní třepané kultivaci.



Obr. 4. Změny poměru koncentrace pigmentů v extraktu a filtrátu (o) a poměru absorbancí extraktu (●) při 405 a 510 nm v průběhu kultivace F – % barviv (absorbance) ve filtrátu, E – % barviv (absorbance) v extraktu, E 4 – % absorbance při 405 nm z celkové absorbance extraktu, E 5 – % absorbance při 510 nm z celkové absorbance extraktu

Ze srovnání těchto výsledků s výsledky submerzních třepaných kultivací plyne závěr, že stacionární kultivace v tekutém médiu je pro produkci pigmentů zcela nevhodná. Příčinou této nevhodnosti je pravděpodobně špatné zásobování kyslíkem.

### 4. Kultivace na ztužených půdách

Na všech testovaných půdách (Czapek-Doxův, Sabouraudův, sladinný agar a škrobový agar) se růst projevil po dvou dnech kultivace a produkce pigmentů po 3 dnech (tabulka 1). Červené pigmenty se tvořily pouze na škrobovém agar. Po přelití kolonií Lugolovým roztokem se kolem kolonií vytvořily nezbarvené zóny, což svědčí o hydrolýze škrobu kolem kolonií, pravděpodobně působením  $\alpha$ -amylasy.

Tab. 1. Růst a tvorba pigmentu na některých ztužených médiích

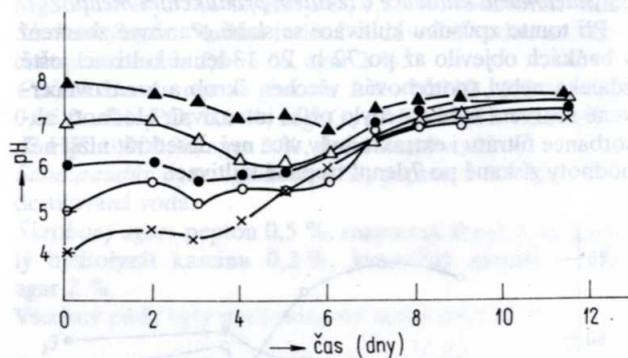
Médium	Nárůst		Barva kolonie	
	2. den	3. den	3. den	4. den
Agar:				
Czapek-Doxův	+	++	žlutá	žlutooranžová
Sabouraudův	++	++	bílá	žlutooranžová
sladinný	++	++	bílá	žlutooranžová
škrobový				
s peptonem	++	++	růžová	červená

Nejlepším substrátem pro tvorbu červených pigmentů je škrob, což se shoduje s výsledky uváděnými v literatuře [6, 7, 8].

### 5. Vliv pH a intenzity aerace na produkci pigmentů v submerzních třepaných kultivacích

Oba vlivy byly zkoumány odděleně. Průběh pH a tvorba pigmentů během kultivace byly sledovány





Obr. 5. Změny pH média v průběhu kultivace x — pH 4, o — pH 5, ● — pH 6, △ — pH 7, ▲ — pH 8

u médií s počátečními hodnotami pH 4, 5, 6, 7 a 8. Bez ohledu na počáteční hodnotu pH se na konci kultivace (po 11 dnech) pohybovala hodnota pH kolem 7 (viz obr. 5). Kunz a Ober [7] popsali změnu pH během kultivace na pH 8. Obrázky 3 A–C znázorňují změny absorbance filtrátu a extraktu během kultivace. Změny počáteční hodnoty pH v rozmezí 4 až 7 neměly výraznější vliv ani na tvorbu biomasy, ani na produkci pigmentů. Jako nejvhodnější se jeví počáteční pH 5–6, což se shoduje se závěrem Lina [6], ale odporuje výsledkům Kunze a Obera [7], kteří jako optimální uvádějí pH 8. Při pH 8 však náš kmen již velmi špatně rostl (ve filtrátu se nezdařilo stanovit absorbanci pigmentů vzhledem k vysokému obsahu nesporebovaného škrobu).

Při zkoumání vlivu vzdušnění na produkci pigmentů byla kultivace prováděna jednak v obvyklých Erlenmayerových baňkách, jednak v baňkách s vpichy („trnitých baňkách“). „Trnité baňky“ zajišťují lepší zásobování kultur kyslíkem. V obou případech byla zkoušena tato plnění 300 ml baňek: 20, 50, 75 a 100 ml. Průběh fermentace z hlediska tvorby pigmentů ukazují obrázky 6 A, B. Nej-

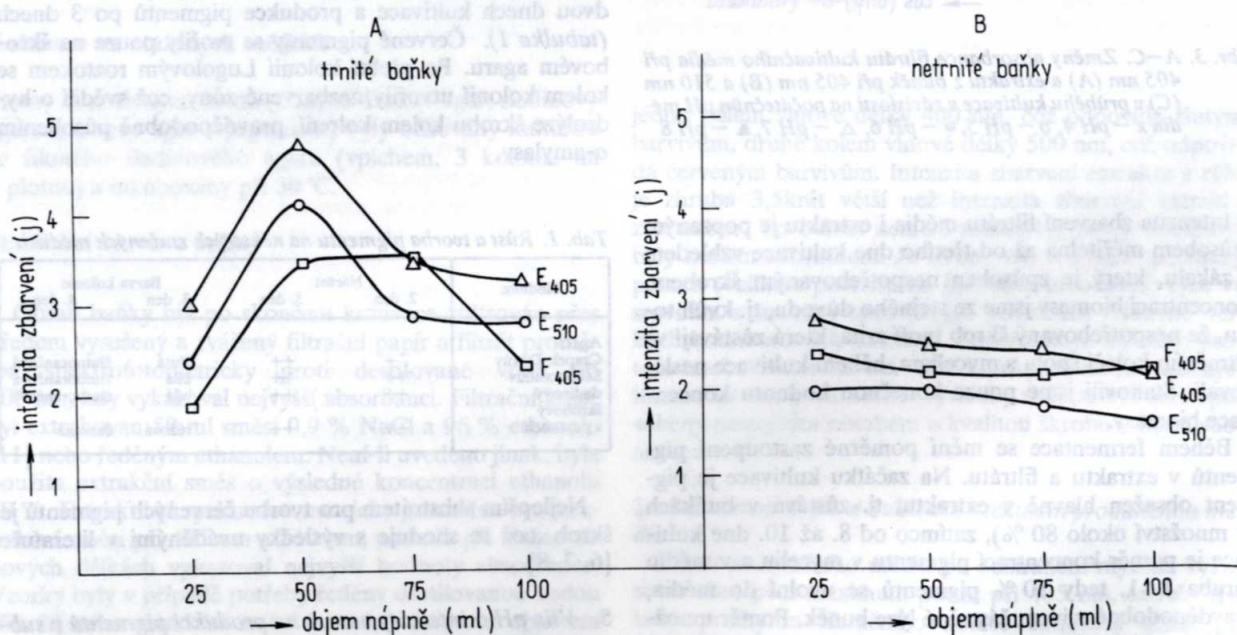
vyšší produkce bylo dosaženo při použití 300 ml Erlenmayerových „trnitých“ baňek s náplní 50 ml, což svědčí o značných požadavcích kultury na vzdušnění. To se zhruba shoduje s výsledky Lina [6], který uvádí jako optimální kultivaci v 500 ml baňkách se 75 ml média.

## ZÁVĚR

Pro tvorbu pigmentů houbou *Monascus* jsou vhodné různé škrobové substráty (kukuřičný škrob, rýže, brambory). Kultivaci je možno provádět stacionárně na pevných substrátech i submerzně. Při submerzní kultivaci je podmínkou intenzivní produkce pigmentů dostatečné zásobování kultury vzdušným kyslíkem. Pro produkci barviv submerzním způsobem je nejvhodnější počáteční pH 5 až 6. Ve všech případech docházelo k produkci červených i žlutých barviv. Při submerzní kultivaci se část pigmentů, které se tvoří v myceliu, uvolňuje do média, a to zejména v pozdějších fázích kultivace. Výsledky ukazují, že produkce pigmentů pomocí houby *Monascus* je poměrně snadná a na suroviny ne příliš náročná. Použití takto získaných pigmentů jako náhrady syntetických barviv v potravinářství je proto perspektivní.

## Literatura

- [1] HESSELTINE, G. W.: Ann. Rev. Microbiol., **37**, 1983, s. 575.
- [2] SHIRAKAWA, T.: Kagawa-ken Hakko Shokulin Shikenjo Hokoku, **79**, 1986, s. 71.
- [3] ZHANG, Y., et al.: Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu CN 85 103 584, 1986.
- [4] OBER, P., KUNZ, B.: Fleischwirtschaft, **69**, 1989, s. 123.
- [5] CARELS, M., SHEPHERD, D.: J. Bacteriol., **122**, 1975, s. 288.
- [6] LIN, C. F.: J. Ferment. Technol., **51**, 1973, s. 407.
- [7] KUNZ, B., OBER, P.: Bioengineering, **3**, 1987, s. 18.
- [8] WONG, H. C., LIN, Y. C., KOEHLER, P. E.: Mycologia, **73**, 1981, s. 649.



Obr. 6. A, B. Absorbance extraktu ( $E_{405}$ ,  $E_{510}$ ) a filtrátu ( $F_{405}$ ) po 7 dnech kultivace při použití „trnitých“ (A) a „netrnitých“ (B) 300 ml Erlenmayerových baňek s různým množstvím média



- [9] HOLKER, J. S. E., STAUNTON, H., WHALLEY, W. B.: J. Chem. Soc., 1964, s. 16.
- [10] HADFIELD, J. R., HOLKER, J. S. E., STANWAY, D. N.: J. Chem. Soc., 1967, s. 751.
- [11] CARELS, M., SHEPHERD, D.: Can. J. Microbiol., **23**, 1977, s. 1360.
- [12] HAWS, E. J., et al.: J. Chem. Soc., 1970, s. 3598.
- [13] CARELS, M., SHEPHERD, D.: Can. J. Microbiol., **24**, 1978, s. 1346.
- [14] McHAN, F., JOHNSON, G. T.: Mycologia, **62**, 1970, s. 1018.
- [15] EVANS, P. J., WANG, H. Y.: Appl. Environm. Microbiol., **47**, 1984, s. 1323.
- [16] Pat. Jap.: 62 210 993.
- [17] YOSHIMURA, M., et al.: Agric. Biol. Chem., **39**, 1975, s. 1789.
- [18] LIN, C. F., SVEN, S. J.: J. Ferment. Technol., **51**, 1973, s. 757.
- [19] WONG, H. C., BAN, Y. S.: Went. Plant Physiol., **60**, 1977, s. 578.
- [20] WONG, H. C., KOEHLER, P. E.: J. Food Sci., **46**, 1981, s. 589.
- [21] TANG, G., HU, Z., CHEN, B.: Acta Microbiol. Sin., **28**, 1988, s. 319.
- [22] YASUDA, M., KUWAE, M., MATSUSHITA, H.: Agric. Biol. Chem., **53**, 1989, s. 247.
- [23] NISHIKAWA, J., et al.: J. Gen. Microbiol., **34**, 1988, s. 467.
- [24] ENDO, A.: J. Antibiot., **33**, 1980, s. 334.
- [25] KOMAGATA, D., et al.: J. Antibiot., **42**, 1989, s. 407.
- [26] NEGISHI, S., et al.: Hakko Kogaku Kaishi, **64**, 1986, s. 509.
- [27] NISHIKAWA, J., et al.: J. Basic Microbiol., **29**, 1989, s. 369.

*Lektoroval Ing. F. Machek, CSc.*

**Jůzlová, P.—Martínková, L.—Ujcová, E.: Produkce přírodních barviv houbou Monascus. I. Vliv kultivačních podmínek na tvorbu barviv.** Kvas. prům., **37**, 1991, č. 7, s. 199–203.

V článku jsou porovnány možnosti kultivace houby *Monascus* na různých škrobových substrátech (rýže, brambory, kukuřičný škrob) při různých způsobech fermentace (povrchová

a submerzní kultivace, růst na ztužených médiích) a při různých kultivačních podmínkách (pH média, intenzita aerace) s ohledem na produkci pigmentů.

**Юзлова, П.—Мартинкова, Л.—Уйцова, Е.: Продукция природных красящих веществ грибом Монаскус. I. Влияние условий культивирования на образование красящих веществ.** Квас. прум., **37**, 1991, № 7, стр. 199–203.

V статье сопоставлены возможности культивирования гриба *Monascus* на разных крахмальных субстратах (рис, картофель, кукурузный крахмал) при разных способах ферментации (поверхностное и субмерзное культивирование, рост на застывших средах) и при разных условиях культивирования (pH среды, интенсивность аэрации) с учетом продукции пигментов.

**Jůzlová, P.—Martínková, L.—Ujcová, E.: Production of Natural Pigments by the Fungus *Monascus* species I. Effect of Cultivation Conditions on the Pigment Formation.** Kvas. prům., **37**, 1991, No. 7, pp. 199–203.

The possibilities of cultivation of the fungus *Monascus* sp. on different starch substrates (rice, potatoes, corn starch) are compared using various fermentation procedures (surface and submerse fermentation, cultivation on solid media) and under different fermentation conditions (pH of the medium, aeration).

**Jůzlová, P.—Martínková, L.—Ujcová, E.: Die Produktion der Farbstoffe durch den Pilz *Monascus* species I. Einfluss der Kultivierungsbedingungen auf die Farbstoffbildung.** Kvas. prům., **37**, 1991, Nr. 7, s. 199–203.

Wir vergleichen die Möglichkeiten der Kultivierung des Pilzes *Monascus* sp. auf verschiedenen stärkehaltigen Nährboden (Reis, Kartoffeln, Maisstärke) in verschiedenen Fermentationsverfahren (Oberflächen- und Submersverfahren, Wachstum auf festen Medien) und unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen (pH-Wert des Mediums, Lüftung) hinsichtlich der Bildung von Farbstoffen.