

## ОПТИМІЗАЦІЯ УМОВ ВИРОЩУВАННЯ ЦВІЛЕВОГО ГРИБА *MONASCUS PURPUREUS*

**Ю.В. Луцшак**

*Кафедра біохімії. Прикарпатський національний університет імені Василя Стефаника.  
e-mail: julialushchak@ukr.net*

*Досліджено вплив складу живильного середовища на синтез біомаси *Monascus purpureus* та проведено ступеневу екстракцію його пігментів. Показано, що оптимальними концентраціями для вирощування гриба є для крохмалю – 1%, для суслу – 50%. Найактивніше ріст відбувався при нейтральних значеннях рН. Також виявили, що пігменти досліджуваного цвілевого гриба найкраще екстрагуються високими концентраціями етанолу (75 та 96%), а для зберігання оптимальними є екстракти із 75% етанолу в розчині.*

**Ключові слова:** *Monascus, пігмент, Mycota.*

*Lushchak Y. V. The optimization of conditions of grow *Monascus purpureus*. The influence of composition of nutritious environment on synthesis of biomass of *Monascus purpureus* was research and was execute extraction of his pigments. Was show the optimal concentrations for grow this mushroom is 1% starch and 50% syrup. The grow most activity was take place by neutral pH. Was discovery pigments of *Monascus purpureus* best extraction with high concentration ethanol (75 and 96%). The optimal for preservation is extract with 75% ethanol in solytion.*

**Key words:** *Monascus, pigment, Mycota.*

### Вступ

*Monascus purpureus* – вид червоного цвілевого гриба, який культивують на субстратах, що містять крохмаль. Твердофазова ферментація рису цим грибом має давню традицію у країнах Східної Азії, яка сягає першого століття нашої ери [2]. Існує багато назв червоного дріжджового рису: в Китаї – Ang Kak, Hong Qu та Koji, в Японії - Beni-Koji, Ang-Kak, Red-Koji, в Європі - Rotchimmelreis, та Red Mould Rise (тобто червоний цвілевий рис) в США [3]. У Європі *M. purpureus* став відомим завдяки голанським вченим, які досліджували використання червоного цвілевого гриба населенням острова Ява [6]. Ферментат (продукт ферментації рису монаскусом) отримується у вигляді яскраво-червоних або пурпурових зерен, має форму звичайних рисових зерен та добре зберігається. В наш час продукт цього цвілевого гриба і надалі використовується як харчовий барвник, консервант, ароматизатор та приправа до м'яса. Доведено, що при додаванні цих пігментів до ковбас та сосисок вони зберігаються щонайменше протягом трьох місяців [7]. Саме пігменти *M. purpureus* при виробництві рисового вина надають йому червоного або пурпурового кольору, а його ферменти ( $\alpha$ -амілази) прискорюють процес перетворення крохмалю в глюкозу. Препарати червоного цвілевого рису використовують для пониження рівню холестеролу в крові людини, який є однією з причин атеросклерозу [2]. Він також знижує рівень триацилгліцеридів, які у надлишку також шкідливі для організму [10]. Активна речовина – монаскідин – має антибактеріальні властивості проти бактерій родів *Bacillus* (*B. subtilis*), *Streptococcus*, *Pseudomonas* [11,12] та *Staphylococcus* (*S. aureus*) [5].

Важливою технологічною проблемою є оптимізація умов вирощування даного цвілевого гриба, оскільки продукти його ферментації, а саме пігменти, можуть використовуватись як замітники штучних харчових барвників.

### Матеріали і методи

Був досліджений вид *Monascus purpureus* NRRL 2897, який отримали із United States Department of Agriculture, США. *M. purpureus* вирощували на середовищі YPDA (2% пептону, 1% дріжджового екстракту, 1% глюкози, 1% агару) при 24-28°C протягом 10 днів і зберігали при 4°C [4].

Петлю зі спорами *M. purpureus* переносили на чашки Петрі з сусло-агаровим середовищем. Наростання відбувалось протягом 7 днів. Після цього за допомогою свердлика вирізали шматочки міцелію однакового діаметру та переносили у рідке середовище об'ємом 15 мл з різними концентраціями досліджуваних речовин: суслу (10, 30, 50 та 100%), крохмалю (0,1; 0,2; 0,5; 0,7 та 1%). При дослідженні впливу рН використовували середовище, яке містило 50% суслу. Середовище довели кислотами та лугами до наступних значень рН: 1,0; 3,0; 5,0; 7,0; 9,0. Інкубували при 24-26°C протягом 7 днів на шейкері (120 коливань за хв). Після цього біомасу відфільтровували та зважували. Всі дослідження проводились щонайменше у двох повторях.

Екстрагування пігментів з *M. purpureus* проводили водою та різними концентраціями етанолу (25, 50, 75 та 96%). Для цього 100 мг сухого ферментату гомогенізували з 2 мл етанолу у гомогенізаторі Поттера. Рідку фазу відбирали, а осад повторно екстрагували (3 рази). Кінцевий об'єм екстракту був 8 мл. Визначення оптичної густини проводили на спектрофотометрі Specord M40 відразу після екстрагування, на 8 та 16 добу.

Дані зі спектрофотометра подавались на комп'ютер, оброблялись та переносились в Microsoft Office Excel 2003, в якому будувались графіки.

### Результати та обговорення

Відомо, що ріст біомаси залежить від складу поживного середовища. Метою даної роботи було розробити оптимальну методику вирощування *M. purpureus* у лабораторних умовах. Оскільки в природних умовах монаскус росте на субстратах, які містять крохмаль, для ферментації на шейкері було взято різні його концентрації до 1%. Такий вибір зумовлено тим, що вищі концентрації призводять до агаризації середовища.

Як видно з Рис. 1, у контролі (0% крохмалю) наростання біомаси не спостерігалось. Такий результат зумовлений тим, що грибок є гетеротрофом і не може синтезувати поживні речовини з вуглекислого газу за рахунок енергії світла, як це роблять рослини [1]. При збільшенні концентрації крохмалю до 1% спостерігали експоненційне зростання кривої. Це пояснюється тим, що *Monascus purpureus* традиційно вирощують на рисі (містить 60-70% крохмалю) при твердофазовій ферментації [4]. Тому можна зробити припущення, що ця залежність і надалі буде зростати.

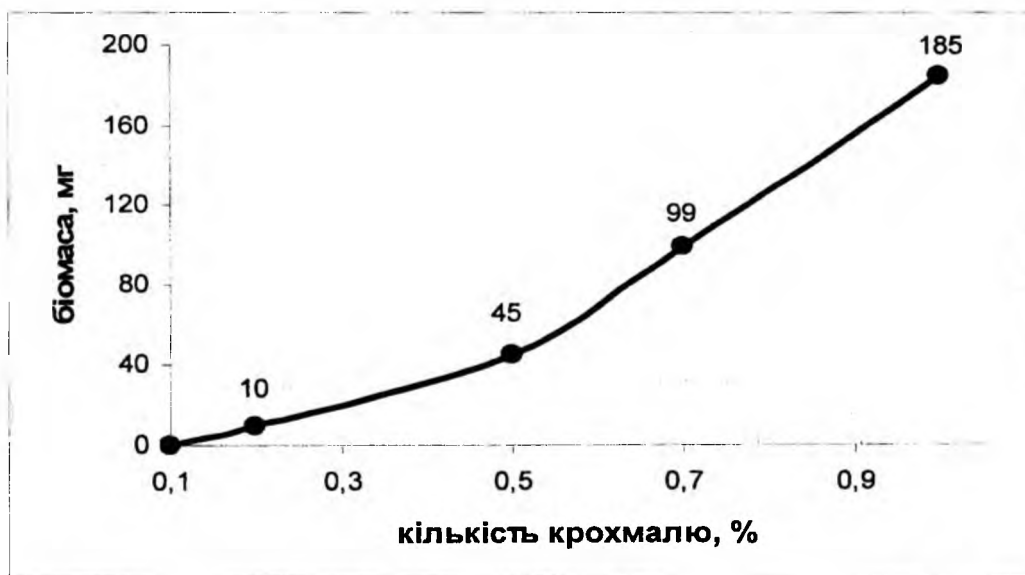


Рисунок 1. Залежність біомаси *M. purpureus* від концентрації крохмалю.

Як видно з Рис. 2 при вирощуванні *M. purpureus* в дистильованій воді росту не спостерігалось, оскільки грибок є гетеротрофом [1]. При концентрації суслу 10% та 30% значної різниці в синтезі біомаси не зареєстровано. Як свідчать дані оптимальною концентрацією суслу є 50%, тоді як при 100% суслі наростання біомаси *M. purpureus* не спостерігалось взагалі. Можливо, це свідчить про перенасиченість середовища поживними речовинами, що призводить до інгібування росту *M. purpureus*.



Рисунок 2. Залежність біомаси *M. purpureus* від концентрації суслу.

Важливе для росту всіх мікроорганізмів, зокрема грибів є значення рН. Як видно з Рис. 3, при вирощуванні *M. purpureus* в середовищі при рН 1,0 синтез біомаси не відбувся. Це означає, що дане значення виходить за допустимі норми. Збільшивши рН із 1,0 до 3,0 отримали різке зростання продукування біомаси. При рН 3,0 – 7,0 біомаса зростала, але не так стрімко, як при 1,0 - 3,0. рН-оптимумом для гриба є нейтральне рН (7,0). Однак, варто зауважити, що навіть при значенні рН 9,0 наростання біомаси відбувається, хоча і з нижчою інтенсивністю. З даного графіка можна зробити наступний висновок: *Monascus purpureus* може наростати в дуже широкому діапазоні рН (від 3,0 до 9,0) з різною інтенсивністю, але рН-оптимумом є 7,0.

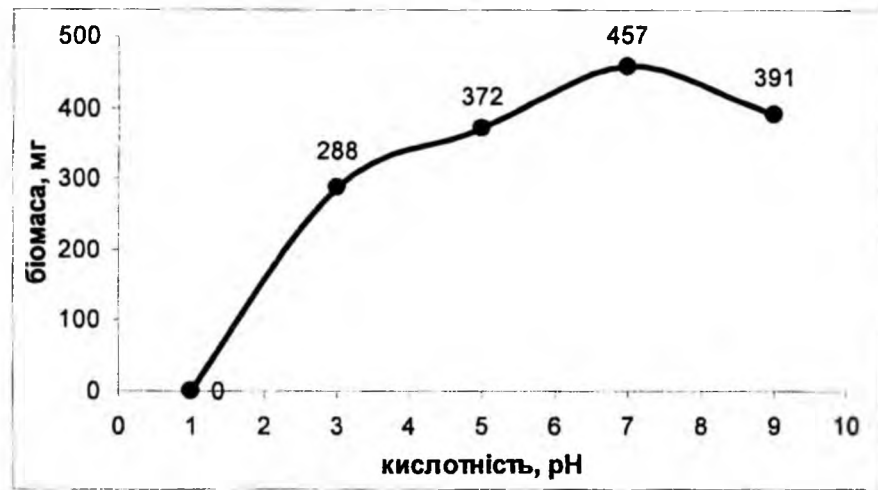


Рисунок 3. Залежність біомаси *M. purpureus* від значення рН.

Надалі ми проаналізували, як впливає на екстрагування пігментів *Monascus* концентрація етанолу. З Рис. 4 видно різницю у розташуванні кривих. Це свідчить про чітку залежність ефективності екстракції пігментів від концентрації етанолу. Найкраще екстрагуються пігменти 96% етанолом. На отриманих кривих добре виражені піки в діапазоні 400, 470 та 500 нм. За даними літератури вони характерні для жовтих, оранжевих та червоних пігментів *Monascus purpureus* відповідно [8, 9].

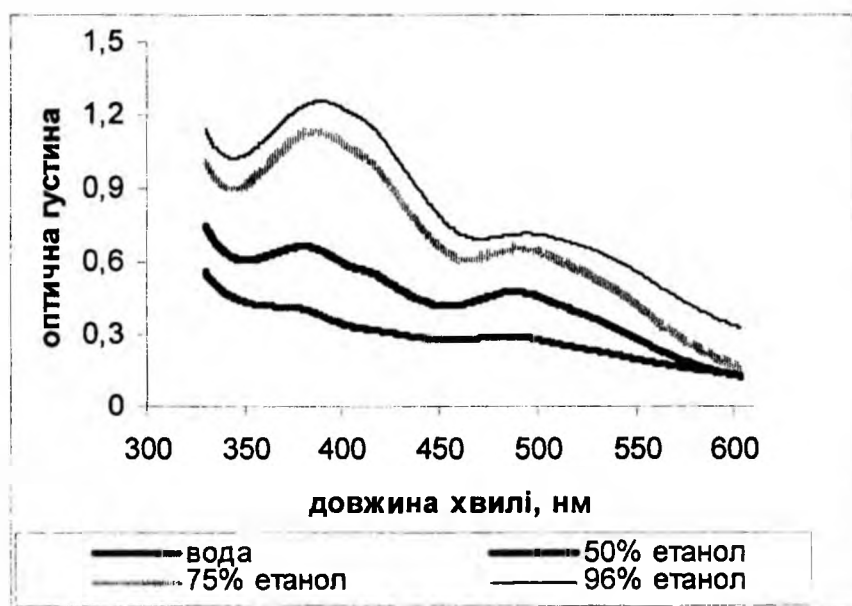


Рисунок 4. Поглинання світла спиртовими екстрактами пігментів *M. purpureus* при різній довжині хвиль.

З Рис. 5 видно, що найкраще зберігаються екстракти пігментів при високих концентраціях етанолу (75 та 96%). Це пояснюється тим, що спиртові настойки пігментів більш стійкі.

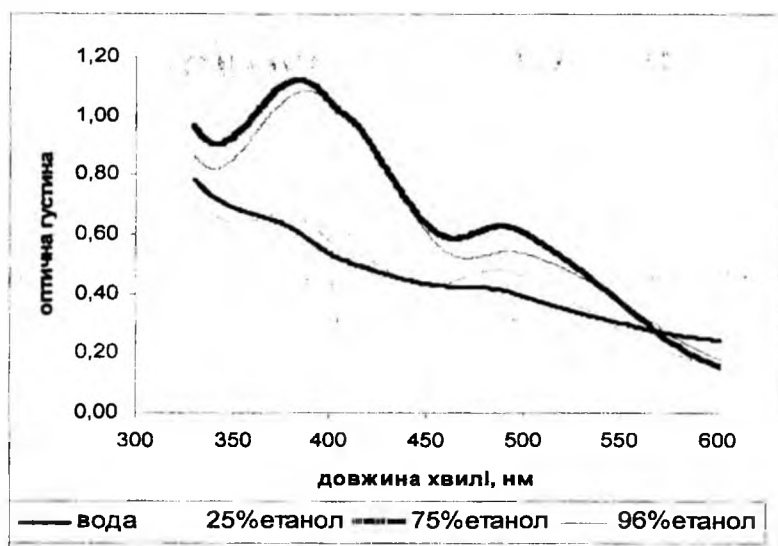


Рисунок 5. Зберігання екстрактів пігментів при різній концентрації етанолу в розчині на 16-й день.

#### Висновки

Отже, з отриманих результатів видно, що для вирощування *M. purpureus* оптимальним є середовище з концентрацією суслу 50%, а крохмалю – 1% та нейтральне рН; екстракцію пігментів найкраще проводити 96% етанолом; стабільнішими є екстракти пігментів із 75 та 96% етанолом в розчині.

#### Література

1. Федоров А. А. (ред.) Жизнь растений в 6-ти т. Т.2. Грибы. – М.: Просвещение – 1976. – с.117-126.
2. Chiu-Hsia C., Kuang-Huei N., Yuan-Kuang G., Tzu-Ming P. Production of red mold rise using a modified Nagata type koji maker // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2006. – 73 – P. 297-304.
3. Bakasova A., Mate D., Laciakova A., Pipova M. Utilization of *Monascus purpureus* in the production of foods of animal origin // Bull. Vet. Inst. Pulawy. – 2001. – № 45 – P. 111-116.
4. De Carvalho J., Pandey A., Oliva Oishi B., Brand D., Rodriguez-Leon J. A., Soccol C.R. Relation between growth, respirometric analysis and biopigments production from *Monascus* by solid-state fermentation. // Biochemical Engineering Journal. – 2006. – № 29. – P. 262-269.
5. Chen M.H., Johns M.R. Effect of carbon source on ethanol and pigment production by *Monascus purpureus* // Enzyme Microb. Technol. – 1994. – N 16 – P. 584-590.
6. Erdogrul O., Azirak S. Rewiew of the studies on the Red Yeast Rise (*Monascus purpureus*) // Turkish Electronic Journal of Biotechnology. – 2004. – Vol. 2 – P. 37-49.
7. Fabre C.E., Santerre A.L., Loret M.O., Baberian R., Pareilleux A., Goma C, et al. Production and food applications of the red pigments of *Monascus ruber* // Journal of Food Science. – 1993. – N 58 – P. 1099-1102.
8. Johns M.R., Stuart D.M. Production of pigments by *Monascus purpureus* in solid culture // J. Ind. Microbiol. – 1991. – N 8. – P. 23-38.
9. Lin C. Isolation and cultural conditions of *Monascus sp.* for the production of pigment in a submerged culture // J. Ferment. Technol. – 1973. – N 51 – P. 407-441.
10. Qui S., Zhang W., Qi P., Zhao M., Li Y., Zu X., Fang Z., Fu L., Rasheva T., Hallet N.J., Kujumdzieva A. Taxonomic Investigation of *Monascus purpureus* 94-25 Strain // Journal of Culture collections. – 1997. – N 2. – P. 1997-1998.
11. Wong H. C., Bau Y. S. Pigmentation and antibacterial activity of fast neutron- and X-ray-induced strains of *Monascus purpureus* Went // Plant Physiol. – 1977. – N 60. – P. 578-581.
12. Wong H. C., Koehner P. E. Production and isolation of an antibiotic from *Monascus purpureus* and its relationship to pigment production // J. Food Sci. – 1981. – N 46. – P. 589-592.

Стаття поступила до редакції 29.03.2008 р.; прийнята до друку 20.04.2008 р.

Луцак Ю. В. – магістрант кафедри біохімії Прикарпатського національного університету імені Василя Стефаника.

Рецензент: професор, доктор біологічних наук Мазепа І.В., професор кафедри біохімії Прикарпатського національного університету імені Василя Стефаника