

## PHÂN LẬP, TUYỂN CHỌN VÀ ĐỊNH DANH CHỦNG VI NẤM *Monascus* sp. SINH TỔNG HỢP CITRININ THẤP

Nguyễn Thị Thùy Trang, Đạo Nữ Diệu Hồng, Nguyễn Thị Dung, Bùi Lê Khả Tú,  
Võ Nguyễn Thanh Thảo, Nguyễn Văn Toàn, Hà Thị Loan

Trung tâm Công nghệ sinh học Thành phố Hồ Chí Minh

### TÓM TẮT

Tăng lipid máu là tình trạng tăng một hoặc nhiều thông số lipid máu như HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, triglycerid dẫn đến nhiều bệnh lý và biến chứng nguy hiểm như nhồi máu cơ tim, tai biến mạch máu não... Hiện nay, gạo lên men đỏ từ chủng nấm mốc *Monascus* sp. đã được ghi nhận là liệu pháp tự nhiên hàng đầu cho cơ thể gặp các vấn đề về tăng lipid máu. Nghiên cứu này hướng đến phân lập và tuyển chọn chủng *Monascus* sp. tạo sắc tố đỏ và monacolin K có hoạt tính sinh học liên quan đến khả năng làm giảm cholesterol, đồng thời hàm lượng độc tố citrinin sinh ra thấp, đạt điều kiện an toàn khi ứng dụng vào sản xuất sản phẩm. Kết quả nghiên cứu đánh giá trên 10 chủng, trong đó có 1 chủng chuẩn *Monascus purpureus* làm đối chứng và 9 chủng vi nấm phân lập được có hình thái tương tự vi nấm *Monascus* sp. Tất cả 10 chủng đều tạo sắc tố đỏ với hàm lượng từ 59,9 đến 1302,8 AU/g và có sự xuất hiện vạch tương ứng với lovastatin trên tấm sắc ký bản mỏng (TLC). Bốn chủng gồm GHR1, C1.11, C2.8 và *M. purpureus* không thể hiện rõ vạch citrinin bằng phương pháp định tính được lựa chọn để đánh giá sự phát triển của hệ sợi và định lượng hàm lượng citrinin. Chủng GHR1 và C2.8 thể hiện đường kính khuẩn lạc lớn nhất sau 21 ngày nuôi cấy, đạt lần lượt  $75,5 \pm 1,3$  mm và  $74,8 \pm 3,8$  mm, trong khi đó chủng C1.11 có hàm lượng citrinin sinh ra thấp nhất, chỉ 0,002 ppm. Vì vậy, chủng C1.11 được chọn để tiến hành định danh sinh học phân tử, kết quả tương đồng hơn 99% với chủng *M. purpureus*, tiềm năng ứng dụng sâu hơn nhằm tạo các sản phẩm bảo vệ sức khỏe hỗ trợ giảm cholesterol.

*Từ khóa:* Citrinin, cholesterol, gạo lên men đỏ, monacolin K, *Monascus* sp., tim mạch, triglycerid.

### MỞ ĐẦU

Nấm mốc *Monascus* có ưu điểm dễ sinh trưởng trên các chất nền đơn giản như gạo, đậu nành hay các loại ngũ cốc khác, tổng hợp được các hợp chất chuyển hoá mang nhiều hoạt tính sinh học có giá trị, trong đó đáng chú ý nhất là các sắc tố (đỏ, cam, vàng) và monacolin K (Egea *et al.*, 2023). Vì vậy, từ xa xưa loại nấm mốc này đã được sử dụng trong y học cổ truyền và trong nền ẩm thực ở các nước châu Á như một chất tạo màu tự nhiên. Monacolin K là một dạng lactone của lovastatin, được xem là một statin tự nhiên, nổi bật với khả năng làm giảm mức cholesterol ở người và được đánh giá như một loại thuốc hạ lipid máu (Suraiya *et al.*, 2018), đồng thời có khả năng hỗ trợ điều trị bệnh cơ (Vercelli *et al.*, 2006) và bảo vệ hệ thần kinh (Lin *et al.*, 2015). Matthew và đồng tác giả (2009) đã kết luận rằng trong 2,4 g men gạo đỏ có thể chứa khoảng 4,8 mg lovastatin, tương đương 0,2% tổng liều cần dùng một ngày. Bên cạnh monacolin K, sắc tố đỏ cũng được nhiều nghiên cứu đánh giá cao về các hoạt tính sinh học tốt cho sức khỏe như giảm huyết áp, kháng khuẩn, kháng ung thư (Hsu *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2017) cũng như khả năng hạ đường huyết và điều hoà quá trình chuyển hoá lipid và cholesterol (Zhou *et al.*, 2019). Vì những lợi ích kể trên, y học hiện đại đã ghi nhận gạo lên men đỏ từ nấm *Monascus* là liệu pháp tự nhiên hàng đầu cho người có cholesterol cao, đã được chấp thuận sử dụng như một loại thực phẩm bổ sung hay trong các đơn thuốc theo toa ở châu Á, Hoa Kỳ và các nước châu Âu. Tuy nhiên, trong quá trình lên men, loại nấm *Monascus* cũng sản sinh độc tố citrinin gây nhiều tác động không tốt cho gan và thận, đặc biệt là chi *Monascus purpureus*. Kiểm soát nồng độ citrinin là một vấn đề cực kì quan trọng vì citrinin có tính chất bền với nhiệt, nhiệt độ phân hủy lên đến 172°C ở điều kiện khô và ở 140°C trong nước, hơn nữa các sản phẩm phân hủy thu được khi đun nóng citrinin với nước ở 140–150°C có độc tính ngang bằng hoặc độc hơn citrinin ban đầu (Pan *et al.*, 2014). Nồng độ an toàn của citrinin được đề xuất trong các sản phẩm lên men của *Monascus* là 2 ppm hoặc thấp hơn ở nhiều quốc gia trên thế giới (Chai *et al.*, 2020).

Vì vậy, bên cạnh việc phân lập, tuyển chọn chủng *Monascus* sp. có sinh tổng hợp sắc tố đỏ và monacolin K, quá trình sàng lọc chủng ít sinh ra citrinin cũng cần được quan tâm. Đây là một hướng nghiên cứu phù hợp và cần thiết tạo tiền đề ứng dụng vào các sản phẩm có chất lượng và an toàn nhằm chăm sóc sức khỏe và hỗ trợ giảm cholesterol trong tương lai, đồng thời gia tăng giá trị kinh tế cho ngành nông nghiệp sản xuất gạo của Việt Nam.

### VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

#### Vật liệu

Mẫu gạo và bột gạo đỏ (bột hồng cúc) được thu thập trên địa bàn Thành phố Hồ Chí Minh.

## Phương pháp nghiên cứu

### Phương pháp phân lập và sàng lọc chủng nấm *Monascus*

Một gam các mẫu cơm để lên men tự nhiên và các sản phẩm bột gạo đồ thu thập trong thị trường được cấy vào đĩa thạch môi trường PDA (Potato Dextrose Agar), ủ ở 28°C và theo dõi liên tục từ 5 đến 17 ngày. Khi sợi nấm lan to, cấy chuyển qua đĩa môi trường MGA (Maltose, Glucose, Agar) để quan sát hình thái và chọn lọc dựa trên các đặc điểm đặc trưng về hình dạng khuẩn lạc, màu sắc, và quan sát hình thái vi thể dưới kính hiển vi quang học.

### Phương pháp định tính khả năng sinh monacolin K và citrinin

Định tính khả năng sinh monacolin K và citrinin được tiến hành theo phương pháp của Seenivasana và đồng tác giả (2015) có điều chỉnh. Cụ thể, sinh khối nấm được nuôi trên môi trường MGA trong 14 ngày, sau đó đông khô ở nhiệt độ -80°C. Mẫu nấm đông khô sau khi thu được bổ sung thêm 20 mL ethyl acetate và 5 mL nước cất để lắc qua đêm ở 28°C, 200 rpm/phút. Tiến hành lọc dịch chiết qua giấy lọc, thu dịch nổi, cô quay nhằm cô đặc dịch chiết và thực hiện định tính monacolin K và citrinin trên tấm sắc ký.

Sự hiện diện của monacolin K được xác định bằng pha động với hệ dung môi gồm dichloromethane:acetone (8:1) và citrinin được xác định bằng pha động là hệ dung môi cloroform:acetone:ethanol (5:4:1,5). Các chủng nấm xuất hiện vạch tương đương với vạch chuẩn được đánh giá có monacolin K và citrinin.

### Phương pháp khảo sát khả năng sinh sắc tố đỏ

Đánh giá khả năng sinh sắc tố đỏ của các chủng nấm theo phương pháp của Chen và đồng tác giả (2022), cụ thể như sau: sinh khối nấm nuôi trên môi trường MGA sau 21 ngày được sấy khô 24 giờ ở nhiệt độ 50°C, nghiền mịn. Ethanol 70% được bổ sung vào mẫu theo tỷ lệ 50:1 và lắc 200 rpm ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ, ly tâm 7000 rpm trong 10 phút thu dịch nổi, đo độ hấp thụ ở các bước sóng 505 nm (sắc tố đỏ) với mẫu đối chứng âm là ethanol 70%.

Tổng sắc tố hấp thụ được tính theo công thức:  $(AU/g) = Abs \times (10/0,5) \times df$ .

Trong đó: Abs: độ hấp thụ mẫu, df: hệ số pha loãng.

### Phương pháp khảo sát sự phát triển của khuẩn lạc

Tốc độ phát triển của các chủng nấm được đánh giá bằng cách đo đường kính phát triển của sợi tơ nấm lan trên đĩa petri ở các thời điểm sau 7, 14, 21 ngày nuôi trên môi trường MGA.

Đường kính hệ sợi trên đĩa petri được tính theo công thức:

$$d = \frac{d_1 + d_2}{2} \text{ (mm)}$$

Trong đó,  $d_1$  (mm) và  $d_2$  (mm) là độ dài hai đường chéo phần khuẩn lạc phân bố,  $d$  (mm) là giá trị trung bình của đường kính hệ sợi.

### Phương pháp định lượng citrinin bằng phân tích LC-MS/MS

Sinh khối khô chủng nấm khảo sát được chiết xuất bằng ACN (1:100 w/v) trong máy siêu âm ở 30°C trong 30 phút, sau đó gia nhiệt cách thủy ở 60°C trong 1 giờ và ly tâm ở tốc độ 3500 vòng/phút trong 10 phút, thu dịch nổi. Bổ sung 0,01 g chất hấp phụ (MgSO<sub>4</sub>: Na-Acetate, điều chỉnh) vào 1 mL dịch nổi sau đó ly tâm ở tốc độ 10000 vòng/phút trong 5 phút. Lọc qua màng lọc 0,2 µm và bơm dịch lọc vào máy LC-MS/MS (ACQUITY UPLC I-Class, Waters). Chuyển mẫu vào vial và đem phân tích bằng LC-MS/MS. Đường chuẩn được xác định với các nồng độ và diện tích peak liên quan.

Pha động và chế độ gradient: Thay đổi và tối ưu thành phần pha động với mẫu, mẫu chuẩn và chất chuẩn bằng cách thay đổi thành phần và tỷ lệ pha động: thực hiện phân tích mẫu thêm chuẩn lần lượt với pha động. Cố định các điều kiện sắc ký: Cột C18, tốc độ dòng: 0,3 mL/ phút, thể tích bơm mẫu 5 µL. Pha động 1: Kênh A: 10 mM amonium formate trong H<sub>2</sub>O (0,1% HCOOH) Kênh B: ACN (0,1% HCOOH). Pha động 2: Kênh A: 10 mM Amonium acetate trong MeOH (0,1% HCOOH) Kênh B: ACN (0,1% HCOOH).

### Phương pháp định danh loài

Chủng nấm tối ưu nhất sẽ được chọn để định danh loài bằng phương pháp giải trình tự ở vùng ITS và LSU. Sinh khối nấm được nuôi trong môi trường PDB ở 28°C trong 72 giờ, được tách chiết DNA tổng số, khuếch đại vùng gene ITS và vùng LSU bằng phản ứng PCR với cặp mồi ITS5 (GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) và LR7 (TAC TAC CAC CAA GAT) bao gồm các thành phần phản ứng 2.5 µL Buffer 10X, 2.5 µL dNTP, 0.5 µl Mồi xuôi (10µM), 0.5 µl Mồi ngược (10µM), 0.25 µl Taq DNA polymerase, 2 µl DNA tổng số (10 - 100 ng), ddH<sub>2</sub>O vừa đủ 25 µl với chu trình nhiệt: biến tính DNA ở 95°C trong 1 phút, gắn mồi ở 56°C trong 45 giây, tổng hợp kéo dài DNA 72°C trong 1 phút và kết thúc bằng giai đoạn ổn định sản phẩm ở 72°C trong 7 phút và lưu trữ ở 4°C. Tinh sạch sản phẩm PCR theo bộ kit GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Scientific). Thực hiện PCR phản ứng PCR sequencing thể tích 10 µL với BigDye™ Terminator 3.1 Ready Reaction Mix. Sản phẩm PCR sequencing được tinh sạch





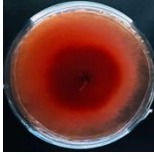




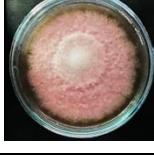

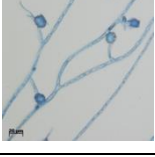


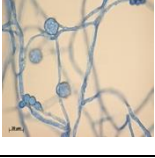
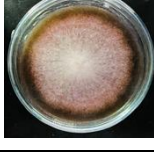
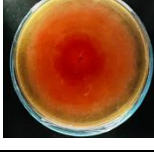




bằng Sephadex G-50. Bổ sung 15 µl HiDi, gia nhiệt 95°C trong 5 phút, giải trình tự 3500, tinh sạch sản phẩm PCR, giải trình tự Sanger, xác định trình tự tự động bằng máy ABI 3500 Genetic Analyzer, phân tích trình tự bằng chương trình BLAST của NCBI, xây dựng cây phát sinh loài bằng phần mềm MEGA-10, phân tích phát loài bằng phương pháp Neribor Joining với chỉ số bootstrap là 1000, định danh các chủng đã phân lập.



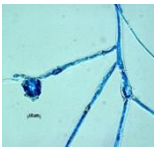


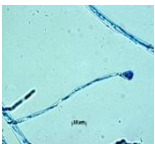
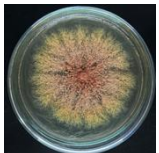

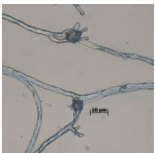
**KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

**Phân lập và tuyển chọn chủng *Monascus***

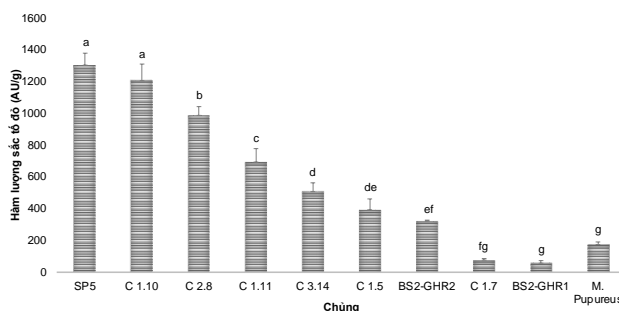
Từ hơn 20 mẫu gạo và sản phẩm bột gạo đỏ, nghiên cứu đã phân lập và sàng lọc được 9 chủng vi nấm nghi ngờ là chủng *Monascus* với hình thái khuẩn lạc và vi thể theo mô tả của của Alberto và đồng tác giả (2004). Hệ sợi ban đầu có màu trắng sau đó chuyển dần sang màu đỏ, hồng hoặc cam, vàng. Khi quan sát dưới kính hiển vi, sợi nấm có cấu trúc phân đốt, có vách ngăn, bào tử túi có hình cầu (đơn độc) hoặc hình trứng (đơn độc hoặc theo chuỗi). Hình thái cụ thể của từng chủng đề thể hiện ở Bảng 1.

**Bảng 1. Hình thái khuẩn lạc và vi thể các chủng vi nấm phân lập nghi ngờ là chủng *Monascus* sp.**

Chủng phân lập	Hình ảnh khuẩn lạc		Hình ảnh vi thể	Mô tả
	Mặt trước	Mặt sau		
SP5				<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tơ nấm có màu đỏ ở trung tâm, có các vòng tròn đồng tâm màu hồng và trắng xen kẽ, rìa chia thùy.</li> <li>- Sợi nấm có cấu trúc phân nhánh, có vách ngăn. Túi bào tử hình trứng, theo chuỗi 3-4 bào tử.</li> </ul>
C3.14				<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tơ nấm có màu trắng và phồng lên ở trung tâm chuyển sang màu hồng nhạt, mặt sau vùng trung tâm có màu đỏ đậm chuyển nhạt dần.</li> <li>- Sợi nấm có cấu trúc phân nhánh, có vách ngăn. Túi bào tử hình trứng, đơn độc.</li> </ul>
C2.8				<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tơ nấm có màu vàng cam, rìa gợn sóng. Mặt sau có màu cam đậm ở trung tâm chuyển dần sang màu vàng.</li> <li>- Sợi nấm có cấu trúc phân nhánh, có vách ngăn. Túi bào tử hình trứng theo chuỗi (3-4 bào tử) và hình cầu (đơn độc).</li> </ul>
C1.5				<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tơ nấm có màu trắng và phồng lên ở trung tâm chuyển sang màu hồng nhạt, mặt sau vùng trung tâm có rãnh, màu cam đậm chuyển nhạt dần.</li> <li>- Sợi nấm có cấu trúc phân nhánh, có vách ngăn. Túi bào tử hình trứng, đơn độc.</li> </ul>
C1.11				<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tơ nấm có màu trắng và hồng đồng tâm xen kẽ, rìa gợn sóng. Mặt sau có đỏ đậm.</li> <li>- Sợi nấm có cấu trúc phân nhánh, có vách ngăn. Túi bào tử hình cầu, đơn độc.</li> </ul>
C1.10				<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tơ nấm có trắng ở trung tâm chuyển sang màu hồng nhạt, rìa tròn đều. Mặt sau có màu cam đậm.</li> <li>- Sợi nấm có cấu trúc phân nhánh, có vách ngăn. Túi bào tử hình trứng theo chuỗi (3-4 bào tử) và hình cầu (đơn độc).</li> </ul>
C1.7				<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tơ nấm có màu vàng nhạt ở trung tâm chuyển sang màu trắng, rìa tròn đều. Mặt sau có màu đỏ chuyển vàng nhạt.</li> <li>- Sợi nấm có cấu trúc phân nhánh, có vách ngăn. Túi bào tử hình hình cầu, đơn độc.</li> </ul>

GHR1				<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tơ nấm màu trắng ở trung tâm, chuyển dần sang màu hồng nhạt, rìa gợn sóng.</li> <li>- Sợi nấm có cấu trúc phân nhánh, có vách ngăn. Túi bào tử hình cầu, đơn độc.</li> </ul>
GHR2				<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tơ nấm màu hồng ở trung tâm, chuyển dần sang màu hồng nhạt, rìa có màu cam gợn sóng.</li> <li>- Sợi nấm có cấu trúc phân nhánh, có vách ngăn. Túi bào tử hình trứng, đơn độc.</li> </ul>
<i>M. purpureus</i>				<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tơ nấm màu đỏ ở trung tâm, chuyển dần sang màu vàng cam, rìa chia thùy.</li> <li>- Sợi nấm có cấu trúc phân nhánh, có vách ngăn. Túi bào tử hình cầu, đơn độc.</li> </ul>

**Kết quả khảo sát khả năng sinh sắc tố đỏ**



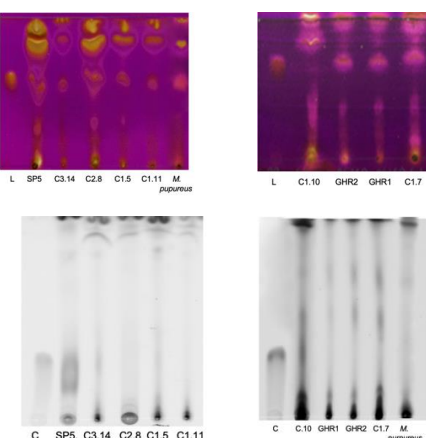
**Biểu đồ 1. Hàm lượng sắc tố đỏ (AU/g) của các chủng nấm nghi ngờ *Monascus* sp.**

Sắc tố đỏ từ *Monascus* được biết đến nhiều như một chất phụ gia tạo màu thực phẩm nhờ tính ổn định, hoà tan tốt và màu sắc tươi sáng. Gần đây, sắc tố đỏ còn được xem là một tiêu chí cần thiết trong các sản phẩm lên men từ *Monascus* vì các lợi ích sức khỏe mà nó đem lại (Xu *et al.*, 2017; Zhou *et al.*, 2019). Biểu đồ 1 thể hiện khả năng sinh sắc tố đỏ của 9 chủng phân lập và chủng *M. purpureus* (đối chứng). Trong đó chủng SP5 sinh sắc tố đỏ cao nhất trong 10 chủng khảo sát, đạt 1302,8 ± 76,9 AU/g và cao gấp 7 lần so với chủng đối chứng và chủng thấp nhất là GHR1 với giá trị đạt 59,9 ± 9,0 AU/g, thấp hơn so với chủng đối chứng 2,9 lần. Kết quả này tương đương với Nguyễn Ngọc Thạnh và đồng tác giả (2022) nghiên cứu trên chủng *M. purpureus* và ở mức trung bình so với nghiên cứu của Nguyễn Minh Lý và Lê Thị Mai (2023). Như vậy, trong 10 chủng khảo sát, tất cả các chủng đều có khả năng sinh sắc tố đỏ nhưng ở các mức độ khác nhau, bốn chủng được đánh giá cao nhất gồm SP5, C1.10, C2.8 và C1.11.

**Kết quả định tính khả năng sinh monacolin K và citrinin**

**Bảng 2. Kết quả định tính Monacolin K và Citrinin ở các chủng phân lập bằng phương pháp TLC**

Chủng	Monacolin K	Citrinin
SP5	+	+
C3.14	+	+
C2.8	+	-
C1.5	+	+
C1.11	+	-
C1.10	+	+
C1.7	+	+
GHR1	+	-
GHR2	+	+
<i>M. purpureus</i>	+	-

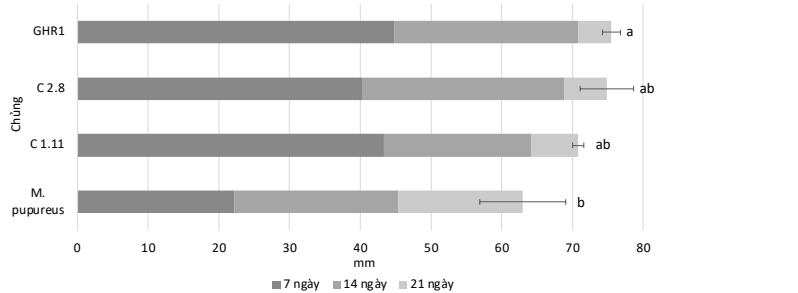


Ghi chú: Chất chuẩn Lovastatin ký hiệu L, Citrinin ký hiệu C.

Trong sản phẩm gạo lên men để ứng dụng giảm cholesterol, hợp chất có lợi mong muốn thu nhận là monacolin K và hợp chất không mong muốn là citrinin. Kết quả định tính khả năng sinh monacolin K và citrinin của các chủng khảo sát được thể hiện trong bảng 2. Trên tấm TLC, tất cả các chủng đều xuất hiện vạch tương ứng với vạch Lovastatin chuẩn, chứng tỏ trong sinh khối nấm có monacolin K. So sánh với vạch citrinin chuẩn, 4/10 chủng gồm C1.11, C2.8, GHR1 và *M. purpureus* không thấy sự xuất hiện vạch tương đương, chứng tỏ các chủng này không sinh hoặc sinh ít citrinin. Vì vậy, bốn chủng C1.11, C2.8, GHR1, *M. purpureus* phù hợp với mục tiêu nghiên cứu nên được lựa chọn để thực hiện các khảo sát tiếp theo.

**Kết quả khảo sát sự phát triển của khuẩn lạc**

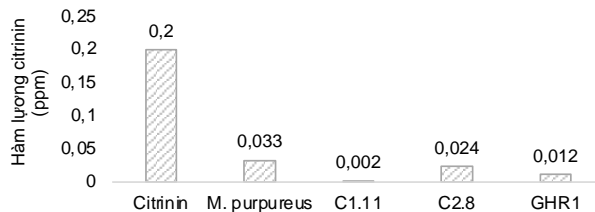
Sự tăng trưởng đường kính khuẩn lạc là một trong những yếu tố được quan tâm nhằm đánh giá khả năng sinh trưởng của các chủng nấm mốc nói chung và *Monascus* sp. nói riêng. Kết quả đánh giá đường kính của 4 chủng GHR1, C2.8, C1.11 và *M. purpureus* được thể hiện trong Biểu đồ 2. Đường kính khuẩn lạc phát triển mạnh mẽ nhất trong 7 ngày đầu, hầu hết chiếm ½ đường kính khuẩn lạc trong thời gian 21 ngày khảo sát. Trong 7 ngày tiếp theo, đường kính phát triển chậm hơn và không tăng nhiều ở thời điểm 7 ngày cuối cùng của khảo sát do sinh khối nấm nhiều và hàm lượng dinh dưỡng trong môi trường bắt đầu cạn kiệt. Trong 4 chủng khảo sát, chủng GHR1 và C2.8 có đường kính khuẩn lạc lớn nhất, đạt lần lượt 75,5 ± 1,3 mm và 74,8 ± 3,8 mm, tiếp đến là chủng C1.11 đạt 70,8 ± 0,8 mm và thấp nhất là chủng *M. purpureus* đạt 63,0 ± 6,1 mm.



**Biểu đồ 2. Đường kính khuẩn lạc (mm) các chủng khảo sát trên môi trường MGA sau 21 ngày**

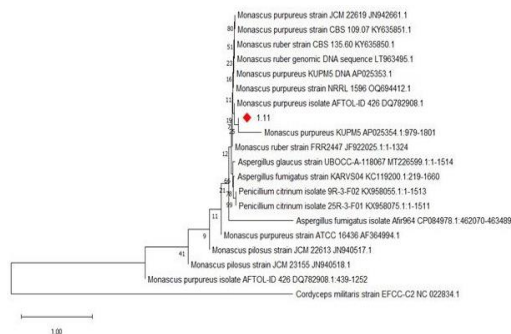
**Kết quả định lượng citrinin bằng phân tích LC-MS/MS**

Hàm lượng citrinin cho phép tối đa trong các sản phẩm lên men *Monascus* là 2 ppm hoặc thấp hơn. Trong nghiên cứu của Ji và đồng tác giả (2015), có 10/12 sản phẩm bột gạo đỏ thương mại phát hiện hàm lượng citrinin từ 0,14 đến 44,24 ppm và 2 sản phẩm không xác định được. Biểu đồ 3 cho thấy cả bốn chủng khảo sát đều có hàm lượng citrinin thấp hơn nhiều so với đối chứng (0,2 ppm), trong đó hàm lượng citrinin thấp nhất ở chủng C1.11 chỉ 0,002 ppm. Do đó, chủng C1.11 có tiềm năng rất lớn để ứng dụng vào các sản phẩm hỗ trợ giảm cholesterol trong tương lai là chủng được chọn để định danh sinh học phân tử.



**Biểu đồ 3. Hàm lượng citrinin (ppm) sinh ra ở các chủng nấm sàng lọc**

**Kết quả định danh loài**



**Hình 1. Cây phát sinh loài vùng ITS5 và LR7 thể hiện mối quan hệ họ hàng của chủng C1.11. Thang 1.00 biểu thị khoảng cách di truyền**

Thông qua kết quả giải trình tự PCR bằng cặp mồi ITS4/ITS5 và LR7-LSU, chủng C1.11 được xác định là chủng *Monascus purpureus* với sự tương đồng cao, lớn hơn 99% trên ngân hàng gen NCBI. Hình 3.6 mô tả cây phát sinh loài thể hiện mối quan hệ gần của chủng C1.11 bằng phương pháp Neighbor-Joining, Maximum Likelihood, bootstrap 1000 trong MEGA.

## KẾT LUẬN

Chủng C1.11 được phân lập từ gạo và định danh sinh học phân tử có trình tự tương đồng với chủng *M. purpureus*. *M. purpureus* cũng là chủng được sử dụng để lên men gạo đỏ phổ biến trong thực phẩm và được phẩm trên thị trường hiện nay. Chủng C1.11 đáp ứng đủ điều kiện chất lượng và an toàn khi ứng dụng trong sản phẩm gạo lên men vì khả năng tổng hợp sắc tố, monacolin K, đồng thời hàm lượng độc tố citrinin sinh ra rất thấp. Tuy nhiên, nghiên cứu cũng cần đánh giá và khảo sát thêm điều kiện nuôi cấy nhằm thu nhận tối đa hàm lượng Monacolin K có thể tổng hợp được ở chủng này.

**Lời cảm ơn:** Nghiên cứu này được tài trợ bởi Sở Khoa học và Công nghệ Thành phố Hồ Chí Minh. Các tác giả xin chân thành cảm ơn Sở Khoa học và Công nghệ Thành phố Hồ Chí Minh cũng như Trung tâm Công nghệ sinh học Thành phố Hồ Chí Minh đã luôn quan tâm và tạo điều kiện để chúng tôi hoàn thành nội dung nghiên cứu.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Alberto MS, José FC, Samir KA, Josep G (2004). New and interesting species of *Monascus* from soil, with a key to the known species. *Stud Mycol*, 50:299–306.
- Chai X, Ai Z, Liu J, Guo T, Wu J, Bai J, Lin Q (2020). Effects of pigment and citrinin biosynthesis on the metabolism and morphology of *Monascus purpureus* in submerged fermentation. *Food Sci Biotechnol*, 29(7):927-937.
- Chen YP, Wu HT, Hwang IE, Chen FF, Yao JY, Yin Y, Chen MY, Liaw LL, Kuo YC. Identification of the high-yield monacolin K strain from *Monascus spp.* and its submerged fermentation using different medicinal plants. *Bot Stud*, 63(1):20.
- Egea BM, Dantas LA, Sousa LT, Lima GA, Lemes CA (2023). The potential, strategies, and challenges of *Monascus* pigment for food application. *Front. Sustain. Food Syst*, 7:1141644.
- Ji X, Xu J, Wang X, Qi P, Wei W, Chen X, Li R, Zhou Y (2015). Citrinin Determination in Red Fermented Rice Products by Optimized Extraction Method Coupled to Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS). *J. Food Sci*, 80(6):1438–1444.
- Lin CM, Lin YT, Lin RD, Huang WJ, Lee MH (2015). Neurocytoprotective effects of aliphatic hydroxamates from lovastatin, a secondary metabolite from *Monascus*-fermented red mold rice, in 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-treated nerve growth factor (NGF)-differentiated PC12 cells. *ACS Chem Neurosci*, 6:716–724.
- Hsu YW, Hsu, LC, Chang, CL, Liang YH, Kuo YH, Pan TM, 2010. New antiinflammatory and anti-proliferative constituents from fermented red mold rice *Monascus purpureus* NTU 568. *Molecules*, 15: 7815–7824.
- Nguyễn Minh Lý, Lê Thị Mai (2023). Tuyển chọn chủng nấm *Monascus purpureus* có khả năng sinh sắc tố đỏ, sắc tố vàng cao nhất và khảo sát hoạt tính kháng khuẩn, kháng oxy hóa của dịch chiết sắc tố. *Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ, Tập 59, Số chuyên đề: Giáo dục Đồng bằng sông Cửu Long*, 86-92.
- Matthew K, Wang S, Ogunkanmi A (2009). Safety and efficacy of red yeast rice (*Monascus purpureus*) as an alternative therapy for hyperlipidemia. *P T*. 34(6):313-27.
- Nguyễn Ngọc Thanh, Phạm Thị Minh Thư, Lưu Minh Châu, Bùi Hoàng Đăng Long, Huỳnh Xuân Phong (2022), *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*, Tập 20, Số 3: 350-358.
- Pan TM, Hsu WH (2014). *Monascus*-Fermented Products. Encyclopedia of Food Microbiology (2nd ed). *Reference Module in Food Science*.
- Seenivasana A, Sathyanarayana NG, Tapobrata P, Thomas T (2015). Quantification of Lovastatin Produced by *Monascus purpureus*. *Open Biotechnol J*, 9:6-13.
- Suraiya S, Kim JH, Tak JY, Siddique MP, Young CJ, Kim JK, Kong IS (2018). Influences of fermentation parameters on lovastatin production by *Monascus purpureus* using *Saccharina japonica* as solid fermented substrate. *LWT Food Sci Technol*, 92(2018):1-9.
- Vercelli L, Mongini T, Olivero N (2006). Chinese red rice depletes muscle coenzyme Q<sub>10</sub> and maintains muscle damage after discontinuation of statin treatment. *J Am Geriatr Soc*, 54(4):718–720.
- Xu B, Wang Q, Sung C (2017). Telomerase Inhibitory Effects of Red Pigment Rubropunctatin and Statin Monacolin L Isolated from Red Yeast Rice. *Genes*, 8(5): 129.
- Zhou W, Guo R, Guo W, Hong J, Li L, Ni L, Sun J, Liu B, Rao P, Lv X (2019). *Monascus* yellow, red and orange pigments from red yeast rice ameliorate lipid metabolic disorders and gut microbiota dysbiosis in Wistar rats fed on a high-fat diet. *Food Funct*, 10(2):1073-1084.

## ISOLATION, SCREENING AND IDENTIFICATION OF *Monascus* sp. LOW CITRININ BIOSYNTHESIS

Nguyen Thi Thuy Trang, Dao Nu Dieu Hong\*, Nguyen Thi Dung, Bui Le Kha Tu,  
Vo Nguyen Thanh Thao, Nguyen Van Toan, Ha Thi Loan

Biotechnology Center Of Ho Chi Minh City

### SUMMARY

Hyperlipidemia is a condition in which one or more blood lipid parameters increase such as HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, and triglycerides, leading to many dangerous diseases and complications such as myocardial infarction, stroke, etc. Red fermented rice from the *Monascus* sp. has been recognized as the natural therapy for the hyperlipidemia body. This study aims to isolate and screen *Monascus* sp. biosynthesis of red pigment and monacolin K as biological activities related to the ability to reduce cholesterol. Besides, the citrinin toxin content produced is low, meeting safe conditions when applied in product production. The study's results were evaluated on 10 strains, including 1 standard strain *Monascus purpureus* as a control and 9 isolated mold strains with morphology similar to *Monascus* sp. All 10 strains produced red pigments with concentrations ranging from 59.9 to 1302.8 AU/g and appeared spots corresponding to Lovastatin on the TLC plate. Four strains including GHR1, C1.11, C2.8, and *Monascus purpureus* that did not clearly show citrinin spot were selected to evaluate the growth of mold mycelium and quantify citrinin content. Strains GHR1 and C2.8 exhibited the largest colony diameters after 21 days of culture, reaching  $75.5 \pm 1.3$  mm and  $74.8 \pm 3.8$  mm, respectively, while strain C1.11 had the lowest amount of citrinin produced only 0.002 ppm. Therefore, strain C1.11 was chosen to conduct molecular biological identification. The results were more similar in sequence than 99% to the *Monascus purpureus* strain. C1.11 strain have the potential for further application to create health protection products that support cholesterol reduction.

**Keywords:** Citrinin, cholesterol, red yeast rice, monacolin K, *Monascus* sp., heart disease, triglycerid.

---

\* Author for correspondence: Tel: 0908746312; Email: dndhong.snn@tphcm.gov.vn