ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
E47365

OPTIMIZATION OF MONACOLIN K BIOSYNTHESIS BY *MONASCUS* SPECIES IN THAI RICE

JANTANA KEEREETAWEEP

MASTER OF SCIENCE

IN PHARMACEUTICAL SCIENCES

THE GRADUATE SCHOOL

CHIANG MAI UNIVERSITY

JANUARY 2009

b00254930

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

E47365

OPTIMIZATION OF MONACOLIN K BIOSYNTHESIS BY *MONASCUS* SPECIES IN THAI RICE

THE NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF THAILAND
RESEARCH LIBRARY

JANTANA KEEREETAWEEP

A THESIS SUBMITTED TO THE GRADUATE SCHOOL IN

PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS

FOR THE DEGREE OF

MASTER OF SCIENCE

IN PHARMACEUTICAL SCIENCES

THE GRADUATE SCHOOL

CHIANG MAI UNIVERSITY

JANUARY 2009

OPTIMIZATION OF MONACOLIN K BIOSYNTHESIS BY *MONASCUS* SPECIES IN THAI RICE

JANTANA KEEREETAWEEP

THIS THESIS HAS BEEN APPROVED

TO BE A PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS

FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE

IN PHARMACEUTICAL SCIENCES

EXAMINING COMMITTEE

....CHAIRPERSON

Assoc. Prof. Dr. Surapol Natakankitkul

....MEMBER

Assoc. Prof. Dr. Nisit Kittipongpatana

....MEMBER

Assoc. Prof. Dr. Renu Pinthong

....MEMBER

Emeritus Prof. Dr. Maitree Suttajit

15 January 2009

©Copyright by Chiang Mai University

AGKNOWLEDGEMENT

First of all, I would like to thank Faculty of Pharmacy, Chiang Mai University for granting me the opportunity to conduct this research.

Second, I would like to express my great gratitude to my major professor, Assoc. Prof. Dr. Surapol Natakankitkul without whom I would not have been able to carry out this research thesis.

Third, I also am highly grateful for benevolent help and inspired ideas of Assoc. Prof. Dr. Nisit Kittipongpatana, Assoc. Prof. Dr. Renu Pinthong and Emeritus Prof. Dr. Maitree Suttajit.

Last, I would like to thank my friends and family for their love, support and encouragement which helped me get through any difficulties that might had happened.

Jantana Keereetaweep

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการชีวสังเคราะห์โมนาโคลิน เค โดยเชื้อราโมแนสคัสในข้าวไทย

ผู้เขียน นางสาว จันทนา คีรีทวีป

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์เภสัชกรรม)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รศ. ดร. สุรพล นธการกิจกุล	ประธานกรรมการ
รศ. ดร. นิสิต กิตติพงษ์พัฒนา	กรรมการ
รศ. ดร. เรณู ปิ่นทอง	กรรมการ

บทคัดย่อ

E47365

โมแนสคัสเป็นราที่เจริญบนเมล็ดข้าวหรือธัญพืชซึ่งถูกใช้ประโยชน์เป็นสารปรุงแต่งอาหาร , สารแต่งสี และ แต่งกลิ่น ทั้งในอาหารและเครื่องดื่ม เช่นเดียวกับเป็นยาแผนโบราณในหลายประเทศในทวีปเอเชียเป็นระยะเวลาหลายร้อยปี

ความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ 3-ไฮดรอกซี 3-เมทิลกลูตาริล โคเอนไซม์ เอ รีดักเทสของข้าวโมแนสคัสมาจากคุณสมบัติของสารกลุ่มโมนาโคลิน ซึ่งรวมถึงโมนาโคลินเค ผลิตภัณฑ์จากโมแนสคัสนี้สามารถใช้ประโยชน์เป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเพื่อป้องกันสภาวะโคเลสเตอรอลสูง และโรคหัวใจภายเมื่อสังเคราะห์ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทดสอบผลของสายพันธุ์โมแนสคัส, อุณหภูมิ, ชนิดของข้าว, ปริมาณความชื้น และปริมาณเชื้อราที่กระทบต่อการผลิตโมนาโคลิน เค และ ซิตรินินจากข้าวไทย ซึ่งได้ค้นพบว่า *Monascus purpureus* BCC 6131 ผลิตโมนาโคลิน เค ในปริมาณที่สูงกว่า *Monascus ruber* TISTR 3006 อย่างมีนัยสำคัญ และ อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับ *Monascus purpureus* BCC 6131 ในการผลิตโมนาโคลิน เค คือ 30°ซ โดย *Monascus purpureus* BCC 6131ผลิตโมนาโคลิน เค ในปริมาณ 109.86 ±5.49 ส่วนในล้านส่วนที่อุณหภูมิดังกล่าว ทั้งนี้ปริมาณโมนาโคลิน เคจากการชีว

E47365

สังเคราะห์ของ *Monascus purpureus* BCC 6131 ที่ 30°ซ เพิ่มขึ้นจาก 109.86 ±5.49 ส่วนในล้านส่วน เป็น 252.07±12.40 ส่วนในล้านส่วนและอัตราส่วนของโมนาโคลิน เคต่อซิตรินินเพิ่มขึ้นจาก 308.20±4.19 ส่วนในล้านส่วนเป็น 785.82±7.70 ส่วนในล้านส่วน เมื่อใช้ข้าวขัดสีในปริมาณ 30 กรัมและลดปริมาณน้ำที่เติมจาก 30 มิลลิลิตรเป็น 20 มิลลิลิตร นอกจากนี้ผลการทดลองยังแสดงให้เห็นว่าโมแนสคัสไม่สามารถใช้ข้าวกล้องและปลายข้าวเพื่อผลิตโมนาโคลิน เคได้ดีเท่ากับเมื่อใช้ข้าวขัดสี และปริมาณของเชื้อส่งผลต่อการชีวสังเคราะห์ของโมนาโคลิน เคโดย *Monascus purpureus* BCC 6131 โดยที่ปริมาณของโมนาโคลิน เค เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องเมื่อเพิ่มปริมาณเชื้อจาก 1ซม^2 ถึง 4 ซม^2 ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าสภาวะที่เหมาะสมในการชีวสังเคราะห์ของโมนาโคลิน เคโดย *Monascus purpureus* BCC 6131 คือที่อุณหภูมิ 30°ซ โดยใช้ข้าวขัดสีปริมาณ 30 กรัม, น้ำ 20 มิลลิลิตร และ เชื้อ 4 ซม^2 โดยปริมาณสูงสุดของโมนาโคลิน เค ที่ผลิตได้คือ 352.09±20.11 ส่วนในล้านส่วน ภายใต้สภาวะดังกล่าว

Thesis Title Optimization of Monacolin K Biosynthesis by *Monascus* Species in Thai Rice

Author Miss Jantana Keereetaweep

Degree Master of Science (Pharmaceutical Sciences)

Thesis Advisory Committee

Assoc. Prof. Dr. Surapol Natakankitkul	Chairperson
Assoc. Prof. Dr. Nisit Kittipongpatana	Member
Assoc. Prof. Dr. Renu Pinthong	Member

ABSTRACT

E 47365

The fungal genus *Monascus* is usually grown by solid culture on the rice grains or cereal. It was widely used as a food additive, as a coloring and flavoring agent in foods and beverages as well as a traditional medicine in Asian nations for several hundred years. The 3-hydroxy-3-methyglutaryl coenzyme A (HMG CoA) reductase inhibiting activity of *Monascus* Fermented Rice comes from a family of naturally occurring substances-monacolins including monacolin K. Under the optimal culture conditions, the product from *Monascus* spp. may serve as a dietary supplement to prevent hypercholesterolemia and, to the extent, heart diseases.

In this study, we investigated how *Monascus* strains, temperature, type of rice substrate, moisture content and inoculum size affect monacolin K and citrinin production on Thai rice. We found out that *Monascus purpureus* BCC 6131

E 47365

significantly produced monacolin K more than *Monascus ruber* TISTR 3006 and the optimum temperature for *Monascus purpureus* BCC 6131 to produce monacolin K was 30°C. At 30°C, *Monascus purpureus* BCC 6131 produced 109.86 ±5.49 ppm of monacolin K and was chosen to conduct the further study. With 30 g of polished rice, when reduce amount of watered added from 30 ml to 20 ml, the production of monacolin K by *Monascus purpureus* BCC 6131 at 30°C was increased from 109.86 ±5.49 ppm to 252.07±12.40 ppm. Additionally, the ratio of monacolin K to citrinin was increased from 308.20±4.19 to 785.82±7.70. The results also further revealed that neither broken rice nor unpolished rice was a better substrate than polished rice itself. Moreover, the data obtained also showed that inoculum size had significant effect on monacolin K production of *M. purpureus* BCC 6131. The amount of monacolin K production increased gradually when the inoculum size was increased from 1cm^2 to 4 cm^2 (352.09±20.11 ppm). It can be concluded that the optimal condition for monacolin K production from *M. purpureus* BCC 6131 at 30°C is 30 g polished rice with 20 ml water added and the inoculum size of 4cm^2. At these conditions, a maximum amount of 352.09±20.11 ppm of monacolin K was produced.

TABLE OF CONTENTS

	page
Acknowledgement	iii
Abstract in Thai	iv
Abstract in English	vi
Table of Contents	viii
List of Tables	xii
List of Figures	xiii
Abbreviations	xv
Chapter 1 Introduction	1
1.1 Introduction of Red Yeast Rice	1
1.2 Objectives of this study	5
1.3 Application advantages of this study	6
Chapter 2 Literature reviews	7
2.1 Botanical data of *Monascus* species	7
2.2 Monacolin K	8
2.3 Clinical Studies	19
2.4 Effects of Monacolin K on Cholesterol Metabolism	22
2.5 Citrinin	24
2.6 Toxicology	28
2.7 Pigments	29

Chapter 3 Experimental 34

3.1 Material 34

3.1.1 Chemicals 34

3.1.2 Glassware 34

3.1.3 Instruments 34

3.1.4 Rice Substrate 35

3.2 Methods 35

3.2.1 Validation of Analysis methods 35

3.2.1.1 Development and optimization of Chromatographic conditions 35

3.2.1.2 Precision and accuracy determination 36

3.2.1.3 Linearity 37

3.2.1.4 Limit of detection and limit of quantitation determination 37

3.2.2 Preparation of red yeast rice and measurement of monacolin K and citrinin 37

3.2.2.1 Microorganisms 37

3.2.2.2 Preparation of substrate and fermentation method 38

3.2.3 Monacolin K analysis 38

3.2.3.1 Extraction of monacolin K 38

3.2.3.2 HPLC conditions for monacolin K analysis 39

3.2.4 Citrinin analysis 39

3.2.4.1 Extraction of citrinin 39

3.2.4.2 HPLC conditions for citrinin analysis 40

3.2.5.1 Effects of *Monascus* strains and cultivation temperatures 40

3.2.5.2 Effect of moisture content on monacolin K production of *M. purpureus* BCC 6131 41

3.2.5.3 Effect of rice substrate on monacolin K production of *M. purpureus* BCC 6131 42

3.2.5.4 Effect of inoculum size on monacolin K production of *M. purpureus* BCC 6131 42

3.2.6 Stability test 43

Chapter 4 Results and Discussion 45

4.1 Validation of Analysis methods 45

4.1.1 Development and optimization of Chromatographic conditions 45

4.1.2 Precision and accuracy determination 46

4.1.3 Linearity 46

4.1.4 Limit of detection and limit of quantitation determination 47

4.2 Optimization of monacolin K production 49

4.2.1 Effects of *Monascus* strains and cultivation temperatures on monacolin K production 49

4.2.2 Effect of moisture content on monacolin K production of *M. purpureus* BCC 6131 50

4.2.3 Effect of rice substrate on monacolin K production of *M. purpureus* BCC 6131 51

4.2.4 Effect of inoculum size on monacolin K production of *M. purpureus* BCC 6131 52

M. purpureus BCC 6131 52

4.2.5 Effects of *Monascus* strains and cultivation temperatures on citrinin production 54

4.2.6 Effect of moisture content on citrinin production of *M. purpureus* BCC 6131 55

4.2.7 Effect of rice substrate on citrinin production of *M. purpureus* BCC 6131 56

4.2.8 Effect of inoculum size on citrinin production of *M. purpureus* BCC 6131 57

4.3 Stability test 60

Chapter 5 Conclusion 62

References 65

Appendices 73

Appendix A Spectra and chromatograms 74

Appendix B *Monascus* cultures 79

Appendix C Statistic analysis 83

Appendix D Instrument 122

Curriculum Vitae 129

LIST OF TABLES

Table		Page
2.1	comparison of adverse effects and food/drugs interactions	28
3.1	Selecting *Monascus* strain and cultivation temperature	40
3.2	optimizing moisture content for monacolin K production of *M. purpureus* BCC 6131	41
3.3	selecting rice substrate for monacolin K production of *M. purpureus* BCC 6131	42
3.3	optimizing inoculum size on monacolin K production	43
4.1	Limit of detection and limit of quantitation determination	47
4.2	monacolin K and citrinin content of red fermented rice from *M. purpureus* BCC 6131 and *Monascus ruber* TISTR 3006 on 18^{th} day of cultivation	58
4.3	monacolin K and citrinin content of red fermented rice from *M. purpureus* BCC 6131 at different moisture contents	59
4.4	monacolin K and citrinin content of red fermented rice from *M. purpureus* BCC 6131 on different types of rice substrate	59
4.5	monacolin K and citrinin content of red fermented rice from *M. purpureus* BCC 6131 at different inoculum sizes	59

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1.1	Structure of monacolin K	2
1.2	Structure of citrinin	5
2.1	cleistothecium with developing asci (ac). The spores are not yet visible	7
2.2	well-developed asci with clearly visible spores (s)	7
2.3	mature cleistothecium. The asci have broken down, releasing the spores that now fill the whole structure.	7
2.4	Hyphae continue to grow around the ascogonium, forming a dense layer of hyphae.	7
2.5	Monacolin K biosynthetic pathway	9
2.6	Inhibition of cholesterol biosynthesis by monacolin K	23
2.7	Structural formula of citrinin isomers	25
2.8	Biosynthesis of citrinin and red pigment in *M.ruber*.	26
2.9	Pigments produced by the genus *Monascus*	27
2.10	Probable mechanisms of the biosynthesis of rubropunctatin	30
2.11	Formation of red pigments	31
2.12	Scheme of the biosynthesis of citrinin by *M. ruber*.	31

4.1 Standard curve of monacolin K 48

4.2 Standard curve of citrinin 48

4.3 Effects of Monascus strains and cultivation temperatures on monacolin K production 49

4.4 Effect of moisture content on monacolin K production of *M. purpureus* BCC 6131 50

4.5 Effect of rice substrate on monacolin K production of *M. purpureus* BCC 6131 52

4.6 Effect of inoculum size on monacolin K production of *M. purpureus* BCC 6131 53

4.7 Effects of *Monascus* strains and cultivation temperatures on citrinin production 54

4.8 Effect of moisture content on citrinin production 55

4.9 Effect of rice substrate on citrinin production of *M. purpureus* BCC 6131 56

4.10 Effect of inoculum size on citrinin production of *M. purpureus* BCC 6131 57

4.11 Percent variation of monacolin K in red fermented rice after exposure to different storage conditions 60

ABBREVIATIONS

cm^2	square centimeter
DAD	Diode array detector
Fig	figure
g	gram
HPLC	high performance liquid chromatography
mg	milligram
M.	*Monascus*
L	liter
LOD	limit of detection
LOQ	limit of quantitation
min	minute
ml	milliliter
ppm	part per million
ppb	part per billion
R^2	coefficient of determination
Rpm	round per minute
RSD	relative standard deviation
μL	microliter