

## Obtención de cepas puras de *Monascus spp.* con fines industriales

### Obtaining pure strains of *Monascus spp.* for industrial purposes

Klever Bayardo Ayala Pastaz<sup>1</sup>, Julio Amilcar Pineda Insuasti<sup>2</sup>, Astrid Stefanía Duarte Trujillo<sup>3</sup>, Claudia Patricia Soto Arroyave<sup>4</sup>, Camilo Alejandro Pineda Soto<sup>5</sup>, Luis Adalberto Chamorro Ortega<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Universidad Técnica del Norte (UTN), Ibarra, Ecuador.

<sup>2</sup> Centro Ecuatoriano de Biotecnología del Ambiente (CEBA), Ibarra, Ecuador.

<sup>3</sup> Organización Micológica Internacional (OMI), Florencia, Colombia.

<sup>4</sup> Universidad Católica de Oriente (UCO), Rionegro, Colombia.

<sup>5</sup> Escuela Politécnica Nacional (EPN), Quito, Ecuador

Autor para correspondencia: kleverbayal@gmail.com

Recibido: octubre 27 de 2018

Aceptado: diciembre 28 de 2018

---

#### RESUMEN

*Monascus spp.* es un hongo con gran potencial industrial porque produce monacolina, un tipo de lovastatina natural y diversos pigmentos, generalmente rojos. No obstante, su uso se ha visto limitado por la producción de citrina, una micotoxina. En este contexto, el objetivo de este trabajo fue describir aspectos claves para la obtención de cepas puras de *Monascus spp.* que permita la óptima elección de las cepas con fines industriales. Se describieron las principales etapas de obtención de cepas puras: aislamiento, identificación, caracterización y conservación. Se concluye que la identificación y la conservación son partes claves del proceso, y se propone la especie *M. sanguineus* como una alternativa para la producción de pigmentos, ya que no produce citrina.

**PALABRAS CLAVE:** angkak, banco de recursos genéticos, conservación de especies, pigmento natural.

---

#### ABSTRACT

*Monascus spp.* is a fungus with great industrial potential because it produces monacoline, a kind of natural lovastatin and various pigments, usually red. However, its use has been limited by the production of citrine, a mycotoxin. In this context, the aim of this study was to describe key aspects for obtaining pure strains of *Monascus spp.* that allows the optimal choice of strains for industrial purposes. The main stages of obtaining pure strains were described: isolation, identification, characterization and conservation. It is concluded that the identification and conservation are key parts of the process. The species *M. sanguineus* is proposed as an alternative for the pigment production, as it does not produce citrine.

**KEYWORDS:** angkak, bank of genetic resources, conservation of species, natural pigment.

---

#### INTRODUCCIÓN

Los hongos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza y son esenciales

para la degradación y el reciclaje de la materia orgánica. Durante su metabolismo secundario producen variedad de metabolitos como

enzimas, polisacáridos, antibióticos, pigmentos, alcaloides, ácidos orgánicos, entre otros. Adicionalmente, tienen la facultad de crecer en condiciones ambientales hostiles, por lo que su potencial biotecnológico ha sido estudiado por años (Hajjaj *et al.*, 2000).

*Monascus* spp. es un hongo ascomiceto filamentoso descrito desde 1884; pertenece a la familia Monascaceae, y usualmente es conocido como moho rojo (Vidyalakshmi, Paranthaman, Murugesh, y Singaravadivel, 2009). Se reportan en la literatura alrededor de 20 especies (Species Fungorum, 2016), de las cuales *M. pilosus*, *M. purpureus*, *M. ruber* y *M. floricornis* son las de mayor importancia biotecnológica, por su uso tradicional en la comida oriental (Sabater-Vilar, Maas, y Fink-Gremmels, 1999), donde es muy empleado como colorante y/o conservante del vino, el pescado, las carnes, el queso, el arroz, entre otros productos (Carvalho, Oishi, Pandey, y Soccol, 2005; Pattanagul, Pinthong, y Phianmongkhol, 2007). Sus compuestos son en su mayoría biológicamente activos, por lo que presentan diversas aplicaciones como aditivos, principalmente, en las industrias cosmética, de alimentos y de medicamentos (Pattanagul *et al.*, 2007; Pisareva y Kujumdzieva, 2010).

La monacolina y los pigmentos son los metabolitos de mayor importancia biotecnológica. La monacolina, es un tipo de lovastatina natural, capaz de disminuir el colesterol en la sangre, gracias a la inhibición competitiva de la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa (HMG Co-A) que cataliza la biosíntesis del colesterol; por lo tanto, se pueden emplear para el tratamiento de la hiperlipidemia y enfermedades cardiovasculares (Endo, 1979; Heber *et al.*, 1999). Los pigmentos son los metabolitos de *Monascus* spp. más ampliamente utilizados en la industria alimentaria y biotecnológica como colorantes naturales, saborizantes y conservantes (Pisareva y Kujumdzieva, 2010); su uso se ha extendido gracias a que, durante los últimos años, los colorantes sintéticos se han

relacionado con el cáncer. Los pigmentos de coloración roja son los de mayor importancia, ya que pueden ser utilizados como sustitutos de los nitritos y la eritrosina en la elaboración de los cárnicos (Carvalho *et al.*, 2005); sin embargo, se ha cuestionado su empleo porque *Monascus* spp. produce citrina, anteriormente llamada monascidin A (Pattanagul *et al.*, 2007); la cual es una micotoxina que también es producida por *Aspergillus* spp. y *Penicillium* spp., y tiene efectos cancerígenos, mutágenos, citotóxicos, hepatotóxicos, nefrotóxicos y teratogénicos (Chan y Shiao, 2007), lo que pone en juego el reconocimiento de inocuidad GRASS otorgado por la FDA (Nout, 2007).

Para evaluar el riesgo de toxicidad se han realizado exámenes genómicos, encontrándose que sólo las cepas de las especies *M. purpureus* y *M. kaoliang* poseen los genes que expresan citrina (Y.-P. Chen *et al.*, 2008). Además, recientemente, se desarrolló un método que permite separar la citrina de los alimentos mediante su unión a nanopartículas magnéticas de superficie activa maghemita, gracias a los grupos quelantes de hierro que posee, principalmente Ceto-enoles (Magro *et al.*, 2016).

En vista de los altos costos económicos de la nanotecnología, es importante seleccionar en la práctica, las cepas de *Monascus* spp. que producen grandes cantidades de biopigmentos con bajo o nulo contenido de citrinina (M.-H. Chen y Johns, 1993). En este contexto, el objetivo de este trabajo fue describir aspectos claves para la obtención de cepas puras de *Monascus* spp., mediante una amplia revisión de la literatura que permita la óptima elección de las cepas con fines industriales.

## AISLAMIENTO DE CEPAS

Se reportan aislamientos a partir de alimentos como puré de sorgo (Lin y Demain, 1991), arroz contaminado (Carvalho *et al.*, 2005), aceitunas verdes procesadas térmicamente

(Panagou, Katsaboxakis, y Nychas, 2002), angkak (Kim, Kim, Oh, Jee-Hwan, y Lee, 2010), cuajada de soja fermentada (Yongsmith, Tabloka, Yongmanitchai, y Bavavoda, 1993), papas, avena, frutas y forraje ensilado (Samson, Hoekstra, Frisvad, y Filtenborg, 2002); suelo pedregoso-arenoso (Stchigel, Cano, Abdullah, y Guarro, 2004); arena de raíz de pino (Barnard y Cannon, 1987); sedimentos de ríos (Cannon, Abdullah, y Abbas, 1995); ecosistemas marinos (Landy y Jones, 2006); cuerpos de agua dulce (Kohlmeyer y Kohlmeyer, 1979) y combustible de aviación (Vasilyeva, Chekunova, Bilanenko, Kachalkin, y Polyakova, 2012). Las muestras se toman con un asa y se depositan en alguno de los medios de cultivo reportados en la literatura para el aislamiento de *Monascus* spp.: Agar Papa Dextrosa (PDA, por sus siglas en inglés), Agar Sabouraud, Solución agarosa de Czapek (Palo, Vidal-Adeva, y Maceda, 1960), Agar Batata Dextrosa (BDA, por sus siglas en inglés) (Macario, Palo, Vidal-Adeva, y Maceda, 1960), Agar Rosa Bengala con cloranfenicol (Chairote, Chairote, Wongpornchai, y Lumyong, 2007) y Medio Wong modificado (Lin y Demain, 1991).

Si el material para el aislamiento fueron granos invadidos por el hongo se recomienda esterilizar primero mediante dos inmersiones en etanol al 95 % durante 30 segundos y una lavada intermedia en solución acuosa de hipoclorito de sodio al 0,1 % durante uno a cuatro minutos (Chairote *et al.*, 2007). Para el caso especial de las cepas encontradas en los sedimentos y suelo se aplica el método de aislamiento de placa directa y el medio de cultivo Agar Patata Zanahoria (PCA, por sus siglas en inglés) (Cannon *et al.*, 1995; Stchigel *et al.*, 2004).

Los medios de cultivos inoculados se incuban entre 29 a 32 ° C durante 10 días, o hasta que el micelio se propague por toda la caja de Petri (Carvalho *et al.*, 2005; Lin y Demain, 1991). También se registran las siguientes condiciones de cultivo: 25 a 30 °C durante siete

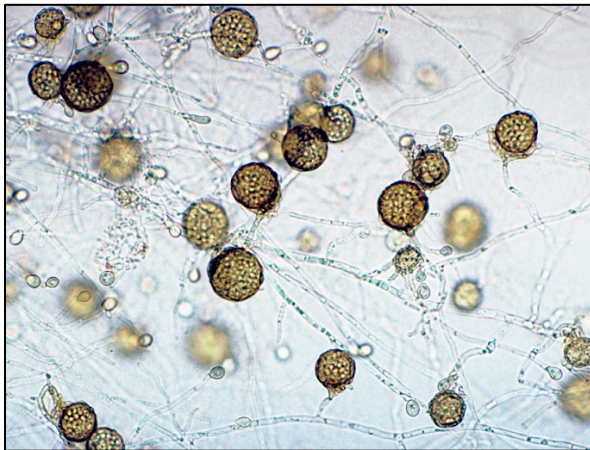
días (Park, Stamenova, y Long, 2004), 30±2 °C durante 3 a 5 días (Chaisrisook, 2002).

## IDENTIFICACIÓN

Algunos de los medios reportados para la comparación de características macroscópicas de las colonias y la medición de tasas de crecimiento, son: Agar Autolisado de Levadura Czapek (CYA, por sus siglas en inglés), Agar Extracto de Malta (MEA), Agar Glicerol 25 N (G25N), Agar Papa Dextrosa (PDA), Agar Harina de Avena (OMA, por sus siglas en inglés) y Agar de Harina de Maíz (CMA, por sus siglas en inglés) a 25 °C durante 7 días. Las mediciones y observaciones tanto de los caracteres morfológicos de las colonias (tamaño, color, forma, textura...) como de los caracteres microscópicos del micelio (hifas, conidios, cleistotecios, esporas, ramificaciones...) se hacen con lactofenol como medio de montaje (Shao, Xu, y Chen, 2011; Stchigel *et al.*, 2004).

*Monascus* spp. se distingue principalmente por su etapa Basipetospora anamorfa y por su cuerpo fructífero o ascoma, que es un cleistotecio ubicado en los extremos de las hifas ramificadas del micelio vegetativo, como muestra la figura 1. El cleistotecio se conforma de dos capas: la interna que está formada por la ampliación de las regiones apicales de las hifas, y la externa que consiste de un entretrejido de hifas que forman su "envoltura". Los ascos dentro de los cuerpos fructíferos están dispuestos al azar y son degradados en las primeras etapas de formación de esporas sexuales (Vasilyeva *et al.*, 2012). Es un hongo homotálico, es decir, que su reproducción sexual se da por dos gametos aportados por el mismo talo (Kamolnan Lakrod, Chaisrisook, y Skinner, s. f.). Las esporas sexuales se denominan ascosporas mientras que las asexuales se denominan conidiosporas; y la unión entre ambos tipos de esporas da origen a los tubos germinativos (Cousin y Blackburn, 2006; Wong y Bau, 1978). Dichas esporas son resistentes al calor y pueden crecer en medios con niveles

reducidos de oxígeno, lo que es característico del género (Panagou *et al.*, 2002). Las hifas son septadas (tabicadas), pero la forma y textura del micelio depende del tipo de especie. El desarrollo de las hifas aéreas y la producción de metabolitos secundarios son modulados por la proteína *mrflbA* (Shao *et al.*, 2011). Chaisrisook (2002) establece que dos cepas pertenecen al mismo Grupo de Compatibilidad de Micelio (GCM) si al sembrarlas en el mismo medio de cultivo crecen como una sola colonia, de lo contrario son incompatibles.



**Figura 1.** Ascomas o cuerpos fructíferos llenos de ascos (Butac, s. f.)

A continuación, se listan algunas características de especies reportadas en la literatura:

### ***M. purpureus***

Su micelio es blanco en los primeros estados de crecimiento, luego cambia al color rosa por la producción de pigmentos, posteriormente se torna de color anaranjado-amarillento característico, con un consecuente aumento de la acidez del medio, y finalmente torna color rojo intenso. Sus ascosporas son esféricas o ligeramente ovoides, con un diámetro de 5 micras o 6x5 micras, respectivamente. Sus conidios son abundantes, germinan más rápido y requieren más nutrientes exógenos que las ascosporas, sin embargo, son menos resistentes al calor. Es la especie más común porque a partir de él se produce el arroz rojo o angkak (Pattanagul *et al.*, 2007; Wong y Bau, 1978). A continuación,

la figura 2 muestra una colonia de *M. purpureus*.



**Figura 2.** Cultivo de *M. purpureus* en agar.

### ***M. pallens***

La colonia presenta crecimiento circular, el micelio aéreo está casi ausente y sin pigmentación (al igual que *M. floridanus*). Las hifas son hialinas, tabicadas, de pared delgada, piriformes, escasamente ramificadas, sin incrustaciones cristalinas, y ocasionalmente anastomosadas. Producen conidios abundantemente y ascosporas elipsoidales de pared gruesa. Los ascomas son parduzcos y se componen por células angulares. Los ascos son difíciles de observar y es probable que sus paredes se descompongan antes de la formación de las paredes de ascosporas. El perfil enzimático es similar al de *M. pilosus* y *M. purpureus*, a diferencia de que no tiene actividad  $\alpha$ -galactosidasa y  $\beta$ -galactosidasa como el primero, ni cisteína arilamidasa como el segundo (Cannon *et al.*, 1995).

### ***M. sanguineus***

La colonia es de forma irregular, plana y varía de flocosa a algodonosa. Su micelio es inicialmente blanco y luego cambia entre rosado a rojo grisáceo. Las hifas tienen paredes lisas, son irregularmente ramificadas, varían de hialinas a marrón pálido. Produce ascomas abundantemente, los cuales tienen forma más o menos globosa y coloración marrón pálido, con ascosporas elipsoidales y gruesas, pero sin presencia de ascos. Morfológicamente es similar a *M. ruber*, pero sin actividad leucina

arilamidasa y  $\alpha$ -galactosidasa. De *M. pilosus* y *M. purpureus* se diferencia en que estos tienen ascomas carentes de color; además no produce las enzimas leucina arilamidasa,  $\alpha$ -galactosidasa y  $\beta$ -galactosidasa que produce el primero, ni la leucina arilamidasa y cisteína arilamidasa que produce el segundo (Cannon *et al.*, 1995).

### ***M. argentinensis***

Su micelio es abundante, delicadamente algodonoso, de color hialino a marrón pálido o gris con márgenes blancos, sin pigmentos solubles. Las hifas son tabicadas, de paredes delgadas, hialinas o de color ligeramente marrón y ramificadas, que anastomosan a veces en fascículos. Produce ampliamente artroconidias o clamidosporas esféricas con forma de barril, intercaladas o laterales, solas o en cadena. Los conidióforos son erectos, con conidiosporas simples o formadas en cadenas cortas de basipétalos. Las conidiosporas son hialinas a café oliváceo pálido, de pared gruesa cuya forma varía de globosa a piriforme, con una base aplanada. Los ascomas son abundantes, no tienen ostiolo, son globosos, de color café oliváceo oscuro, con la cavidad llena de ascosporas hialinas y elipsoidales a globosas (Stchigel *et al.*, 2004).

### ***M. ruber***

Presenta numerosos ascomas circulares y lisos, llenos de ascosporas incoloras, lisas y ovoides de base achatada. Las conidiosporas pueden estar aisladas o ligadas formando cadenas; generalmente son más grandes que las ascosporas, pero su tamaño puede variar hasta alcanzar dimensiones demasiado pequeñas, donde reciben el nombre de microconidios. Las colonias presentan un crecimiento muy rápido, con una morfología algodonosa, circular, rugosa y de coloración rojo-púrpura opaco (Macario *et al.*, 1960).

### ***M. floridanus***

Tiene mucho menos ascosporas que *M. sanguineus*, carece de pigmentos rojos y carece de actividad valina arilamidasa; no

obstante, presenta actividad cisteína arilamidasa (Cannon *et al.*, 1995).

Según Shao, Xu y Chen (2011), existen nueve especies del género *Monascus* spp. aceptadas internacionalmente con base en caracteres de cultivo, sin embargo, se reportan en la literatura más de 20 especies (Species Fungorum, 2016), de las cuales muchas son sinónimo, de modo que las identidades genéticas de este género están todavía en debate.

Tradicionalmente, la identificación microbiana se basa en caracteres fenotípicos, incluyendo propiedades morfológicas, fisiológicas y bioquímicas (Shao *et al.*, 2011); pero esta forma de identificación aplicada a los mohos está cada vez más en desuso, cobrando mayor importancia los métodos de detección de compuestos volátiles, los inmunoensayos, las técnicas moleculares y la espectroscopía de infrarrojo (Cousin y Blackburn, 2006).

Los marcadores moleculares, independientemente de las condiciones culturales proporcionan una herramienta viable para la discriminación de genotipos estrechamente relacionados y la determinación de relaciones genéticas entre diferentes cepas de *Monascus* spp (Shao *et al.*, 2011). Se han empleado varios marcadores moleculares como la Amplificación Aleatoria de ADN Polimórfico (RAPD, por sus siglas en inglés) (K. Lakrod, Chairidook, Yongsmith, y Skinner, 2000; Shinzato, Namihira, Tamaki, Tsukahara, y Matsui, 2009), el gen de  $\beta$ -tubulina, el Espaciador Transcribible Interno (ITS, por sus siglas en inglés) del ADNr (Park *et al.*, 2004) y *Monascus* Retro-Transposón (MRT) (Y.-P. Chen, Tseng, Liaw, Wang, y Yuan, 2007). Estos métodos tienen sus propias ventajas y desventajas. Por ejemplo, RAPD e ITS son fáciles de manejar, pero el primero tiene baja reproducibilidad mientras que el segundo presenta dificultad en la alineación todos los taxones. Por su parte, el análisis filogenético basado en el gen  $\beta$ -tubulina es consistente con

las alineaciones, pero no alcanza a diferenciar entre *M. ruber* y *M. pilosus*. MRT es dependiente del Southern blotting, por ende, es un proceso muy demorado (Shao *et al.*, 2011). Shao y colaboradores (2011) proponen los marcadores de Repetición Inter-Simple de Secuencias (RISS) y Polimorfismos Amplificados de Secuencias relacionadas (PAS) como alternativas moleculares para la clasificación e identificación de cepas de *Monascus* spp. a gran escala o como complementos de los métodos tradicionales, gracias a su simplicidad, reproducibilidad y polimorfismo. El RISS utiliza sólo un cebador para amplificar fragmentos de ADN entre dos microsatélites de repetición idénticos (Zietkiewicz, Rafalski, y Labuda, 1994), mientras que el PAS marca objetivos abiertos de lectura (ORFs, por sus siglas en inglés) en el genoma, utilizando un diseño único de los pares de cebadores (Li y Quiros, 2001). PAS es más informativo que RISS, ya que produce bandas más polimórficas; sin embargo, los dendogramas son muy parecidos pese a las inconsistencias menores en la posición de algunos subgrupos, debido a que amplifican en una región diferente del genoma (Shao *et al.*, 2011).

## CARACTERIZACIÓN

Entre las actividades biológicas de los metabolitos producidos se encuentra: Hipocolesterolémica (Heber *et al.*, 1999), anti-obesidad (Choe, Lee, Woo, y Shin, 2012), anticancerígena (Hsu, Hsu, Liang, Kuo, y Pan, 2011), antiinflamatoria (Cheng, Wu, Yuan, Su, y Yanai, 2012), hipotensora (Kuba, Tanaka, Sesoko, Inoue, y Yasuda, 2009), antifúngica (Tu *et al.*, 2016), antibacteriana (Mukherjee y Singh, 2011), entre otras, que son otorgadas por los compuestos biológicamente activos que produce.

En la tabla 1 se muestran los principales metabolitos producidos por el género *Monascus* spp.

**Tabla 1.** Principales metabolitos secundarios producidos por especies de *Monascus* spp.

| Tipo                   | Metabolito         | Variiedad           |                     |
|------------------------|--------------------|---------------------|---------------------|
| Pigmento<br>amarillo   | Monasquina         | <i>M. ruber</i>     |                     |
|                        | Ancaflavina        | <i>M. purpureus</i> |                     |
|                        | Yellow II          | <i>M. purpureus</i> |                     |
| Pigmento<br>anaranjado | Monascorubrina     | <i>M. ruber</i>     |                     |
|                        | Rubropunctatina    | <i>M. purpureus</i> |                     |
|                        | Monapil            | <i>M. purpureus</i> |                     |
| Pigmento<br>rojo       | Rubropunctamina    | <i>M. purpureus</i> |                     |
|                        | Monascorubramina   | <i>M. purpureus</i> |                     |
| Antibiótico            | Citrina            | <i>M. purpureus</i> |                     |
|                        | (monascidina A)    | <i>M. kaoliang</i>  |                     |
| Enzima                 | Proteasas          | <i>M. purpureus</i> |                     |
|                        | Glucoamilasas      | <i>M. purpureus</i> |                     |
|                        | $\alpha$ -amilasas | <i>M. purpureus</i> |                     |
| Estatina               | Mevinolina         | <i>M. ruber</i>     |                     |
|                        | (Monacolina K)     | <i>M. purpureus</i> |                     |
| Amino-<br>azúcar       | Glucosamina        | <i>M. ruber</i>     |                     |
|                        |                    | <i>M. purpureus</i> |                     |
| Alcohol                | Etanol             | <i>M. purpureus</i> |                     |
|                        | Ácido<br>orgánico  | Ácido acético       | <i>M. purpureus</i> |
|                        |                    | Ácido butírico      | <i>M. purpureus</i> |
| Azafilón               | Acetato            |                     |                     |
|                        | Monascusazafilol   | <i>M. pilosus</i>   |                     |
|                        | Monascuscaolina    | <i>M. kaoliang</i>  |                     |
|                        | Xantomonasina      | <i>M. pilosus</i>   |                     |

La cantidad y tono de los pigmentos producidos es influenciado por el tipo de cepa y su perfil metabólico, al igual que por los nutrientes del medio (fósforo y nitrógeno, principalmente), las condiciones de cultivo (temperatura, pH y humedad, principalmente) y los métodos de cultivo (Carvalho *et al.*, 2005). *Monascus* spp. es un hongo que puede crecer

en un rango de temperatura desde los 15 °C hasta los 45 °C, aunque su óptimo se ubica entre los 25 a 37 °C. Igualmente, puede crecer en un rango de pH de 2,5 a 8,0; siendo el ideal de 4,0 a 7,0 (Carvalho *et al.*, 2005); aunque se reportan casos donde *M. ruber* ha crecido en un rango de pH de 1,7 a 2,0 y una temperatura de 80°C (Nout, 2007).

## ALMACENAMIENTO Y CONSERVACIÓN

Para el almacenamiento de las cepas se emplea generalmente el medio de cultivo PDA a 4°C (Y.-P. Chen *et al.*, 2008), aunque también se usa Agar Extracto de Malta (MEA, por sus siglas en inglés) a 2°C. Para garantizar la viabilidad de las cepas almacenadas en agar, se debe repicar, es decir, realizar durante un semestre subcultivos mensuales antes de uso.

Se reporta que los mejores métodos de almacenamiento para la conservación de las cepas en Bancos de Recursos Genéticos (BRG) son la liofilización y la criopreservación en nitrógeno líquido, que preservan la estabilidad

genética durante más de 40 años (Hawksworth, 1985; Nagai *et al.*, 2005) a una temperatura de -70 °C (Kim *et al.*, 2010).

## CONCLUSIONES

Las etapas para obtener cepas puras de *Monascus* spp. son: aislamiento de cepas, identificación de especies, caracterización, almacenamiento y conservación. El aislamiento debe realizarse en un medio de cultivo con características semejantes a las del sustrato de recolección para garantizar la selectividad; la identificación debe ser óptima, para evitar otorgar erróneamente propiedades o características a las cepas; la caracterización permite encontrar los usos potenciales de la cepa; el almacenamiento es el responsable de conservar la viabilidad y estabilidad genética de la cepa. Se propone aprovechar el potencial en la industria alimentaria de los pigmentos producidos por cepas que no sinteticen citrina, tales como, *M. sanguineus*.

---

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ajdari, Z., Ebrahimpour, A., Manan, M. A., Hamid, M., Mohamad, R., & Ariff, A. B. (2011). Nutritional Requirements for the Improvement of Growth and Sporulation of Several Strains of *Monascus purpureus* on Solid State Cultivation. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 9. <https://doi.org/10.1155/2011/487329>
- Barnard, E., & Cannon, P. (1987). A new species of *Monascus* from pine tissues in Florida. *Mycology*, 79(3), 479–484.
- Butac. (s. f.). BUTAC. Recuperado 3 de septiembre de 2016, a partir de [http://www.butac.it/wp-content/uploads/2015/05/Monascus\\_purpureus\\_Koji\\_Mould.jpg](http://www.butac.it/wp-content/uploads/2015/05/Monascus_purpureus_Koji_Mould.jpg)
- Cannon, P. F., Abdullah, S. K., & Abbas, B. A. (1995). Two new species of *Monascus* from Iraq, with a key to known species of the genus. *Mycological Research*, 99(6), 659–662. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)80523-6](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80523-6)
- Carvalho, J. C. de, Oishi, B. O., Pandey, A., & Soccol, C. R. (2005). Biopigments from *Monascus*: strains selection, citrinin production and color stability. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48(6), 885–894. Recuperado a partir de [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1516-89132005000800004&lng=en&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-89132005000800004&lng=en&nrm=iso&tlng=es)
- Chairote, E., Chairote, G., Wongpornchai, S., & Lumyong, S. (2007). Preparation of red yeast rice using various Thai glutinous rice and *Monascus purpureus* CMU001 isolated from commercial Chinese red yeast rice sample. *KMITL Science Journal*, 7, 28–37. Recuperado a partir de <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.499.7883&rep=rep1&type=pdf>

- Chaisrisook, C. (2002). Mycelial reactions and mycelial compatibility groups of red rice mould (*Monascus purpureus*). *Mycological Research*, 106(3), 298–304. <https://doi.org/10.1017/S0953756202005580>
- Chan, W.-H., & Shiao, N.-H. (2007). Effect of citrinin on mouse embryonic development in vitro and in vivo. *Reproductive Toxicology*, 24(1), 120–125. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2007.04.070>
- Chen, M.-H., & Johns, M. R. (1993). Effect of pH and nitrogen source on pigment production by *Monascus purpureus*. *Applied Microbial and Cell Physiology*, 40(1), 132–138. <https://doi.org/10.1007/BF00170441>
- Chen, Y.-P., Tseng, C.-P., Chien, I.-L., Wang, W.-Y., Liaw, L.-L., & Yuan, G.-F. (2008). Exploring the Distribution of Citrinin Biosynthesis Related Genes among *Monascus* Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(24), 11767–11772. <https://doi.org/10.1021/jf802371b>
- Chen, Y.-P., Tseng, C.-P., Liaw, L.-L., Wang, C.-L., & Yuan, G.-F. (2007). Characterization of MRT, a new non-LTR retrotransposon in *Monascus* spp. *Botanical Studies*, 48, 377–385. Recuperado a partir de <http://ejournal.sinica.edu.tw/bbas/content/2007/4/Bot484-02.pdf>
- Cheng, M.-J., Wu, M.-D., Su, Y.-S., Yuan, G.-F., Chen, Y.-L., & Chen, I.-S. (2012). Secondary metabolites from the fungus *Monascus kaoliang* and inhibition of nitric oxide production in lipopolysaccharide-activated macrophages. *Phytochemistry Letters* (Vol. 5). <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2012.01.008>
- Cheng, M.-J., Wu, M.-D., Yuan, G.-F., Su, Y.-S., & Yanai, H. (2012). Secondary metabolites produced by the fungus *Monascus pilosus* and their anti-inflammatory activity. *Phytochemistry Letters*, 5(3), 567–571. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2012.05.015>
- Choe, D., Lee, J., Woo, S., & Shin, C. S. (2012). Evaluation of the amine derivatives of *Monascus* pigment with anti-obesity activities. *Food Chemistry*, 134(1), 315–323. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.149>
- Cousin, M. A., & Blackburn, C. D. W. (2006). Detection, enumeration and identification methods for spoilage molds. En *Food spoilage microorganisms* (pp. 55–85). Cambridge: Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1533/9781845691417.1.55>
- Endo, A. (1979). Monacolin K, a new hypocholesterolemic agent produced by a *Monascus* species. *J Antibiot (Tokyo)*, 32(8), 852–854. Recuperado a partir de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/500505>
- Hajjaj, H., Blanc, P., Groussac, E., Uribelarrea, J.-L., Goma, G., & Loubiere, P. (2000). Kinetic analysis of red pigment and citrinin production by *Monascus ruber* as a function of organic acid accumulation. *Enzyme and Microbial Technology*, 27(8), 619–625. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(00\)00260-X](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(00)00260-X)
- Hawksworth, D. L. (1985). Fungus Culture Collections as a Biotechnological Resource. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 3(1), 417–453. <https://doi.org/10.1080/02648725.1985.10647820>
- Heber, D., Yip, I., Ashley, J., Elashoff, D., Elashoff, R., Ir, V., & Autor, I. del. (1999). Cholesterol-lowering effects of a proprietary Chinese red-yeast-rice dietary supplement. *Am J Clin Nutr*, 69(2), 231–6. Recuperado a partir de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9989685>
- Hsu, Y.-W., Hsu, L.-C., Liang, Y.-H., Kuo, Y.-H., & Pan, T.-M. (2011). New Bioactive Orange Pigments with Yellow Fluorescence from *Monascus*-Fermented *Dioscorea*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(9), 4512–4518. <https://doi.org/10.1021/jf1045987>
- Kim, J. Y., Kim, H.-J., Oh, Jee-Hwan, J. H., & Lee, I. (2010). Characteristics of *Monascus* sp. isolated from *Monascus* fermentation products. *Food Science and Biotechnology*, 19(5), 1151–1157. <https://doi.org/10.1007/s10068-010-0164-1>
- Kohlmeyer, J., & Kohlmeyer, E. (1979). *Marine Mycology: The Higher Fungi*. New York: Academic Press.



- Kuba, M., Tanaka, K., Sesoko, M., Inoue, F., & Yasuda, M. (2009). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides in red-mold rice made by *Monascus purpureus*. *Process Biochemistry*, *44*(10), 1139–1143. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.06.007>
- Lakrod, K., Chaisridook, C., Yongsmith, B., & Skinner, D. Z. (2000). RAPD analysis of genetic variation within a collection of *Monascus* spp. isolated from red rice (ang-kak) and sofú. *Mycological Research*, *104*(4), 403–408. <https://doi.org/10.1017/S0953756299001434>
- Lakrod, K., Chaisrisook, C., & Skinner, D. Z. (s. f.). Transformation of *Monascus purpureus* to hygromycin B resistance with cosmid pMOcosX reduces fertility. *Electronic Journal of Biotechnology*, *6*(2), 143–147. Recuperado a partir de [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0717-34582003000200007&lng=es&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-34582003000200007&lng=es&nrm=iso&tlng=en)
- Lakshman, P. L. N., Toyokawa, Y., Toyama, H., Taira, T., & Yasuda, M. (2010). Purification and characterisation of two extracellular acid proteinases from *Monascus pilosus*. *Food Chemistry*, *121*(4), 1216–1224. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.02.007>
- Landy, E. T., & Jones, G. M. (2006). What is the Fungal Diversity of Marine Ecosystems in Europe? *Mycologist*, *20*(1), 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.mycol.2005.11.010>
- Li, G., & Quiros, C. F. (2001). Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in Brassica. *Theor Appl Genet*, *103*, 455–461. Recuperado a partir de [https://courses.cit.cornell.edu/jl265/Li\\_and\\_Quiros2001.pdf](https://courses.cit.cornell.edu/jl265/Li_and_Quiros2001.pdf)
- Lin, T. F., & Demain, A. L. (1991). Effect of nutrition of *Monascus* sp. on formation of red pigments. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *36*(1), 70–75. <https://doi.org/10.1007/BF00164701>
- Macario, A. L., Palo, M. A., Vidal-Adeva, L., & Maceda, L. M. (1960). A study on ang-kak and its production. *Philippine J Sci.*, *89*(1), 1–19.
- Magro, M., Moritz, D. E., Bonaiuto, E., Baratella, D., Terzo, M., Jakubec, P., ... Vianello, F. (2016). Citrinin mycotoxin recognition and removal by naked magnetic nanoparticles. *Food Chemistry*, *203*, 505–512. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.147>
- Mukherjee, G., & Singh, S. K. (2011). Purification and characterization of a new red pigment from *Monascus purpureus* in submerged fermentation. *Process Biochemistry*, *46*(1), 188–192. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.08.006>
- Nagai, T., Tomioka, K., Takeuchi, K., Iida, M., Kawada, M., & Sato, T. (2005). Evaluation of Preservation Techniques of Microorganism Resources in the MAFF Genebank. *Japan Agricultural Research Quarterly: JARQ*, *39*(1), 19–27. <https://doi.org/10.6090/jarq.39.19>
- Nout, R. (2007). The Colonizing Fungus as a Food Provider. En R. A. Samson & J. Dijksterhuis (Eds.), *Food Mycology: A Multifaceted Approach to Fungi and Food* (pp. 343–344). Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Palo, M. A., Vidal-Adeva, L., & Maceda, L. (1960). Study on ang-kak and its production. *Philipp. J. Sci. Soc.*, *89*, 1–22.
- Panagou, E. Z., Katsaboxakis, C. Z., & Nychas, G.-J. E. (2002). Heat resistance of *Monascus ruber* ascospores isolated from thermally processed green olives of the Conservolea variety. *International Journal of Food Microbiology*, *76*(1), 11–18. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00748-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00748-6)
- Park, H. G., Stamenova, E. K., & Long, S.-C. (2004). Phylogenetic relationships of *Monascus* species inferred from the ITS and the partial p-tubulin gene. *Bot. Bull. Acad. Sin.*, *46*, 225–230. Recuperado a partir de [http://tao.wordpedia.com/show\\_pdf.ashx?sess=alu30a3pidthll45yeert145&file\\_name=JO00001095\\_45-4\\_325-330&file\\_type=r](http://tao.wordpedia.com/show_pdf.ashx?sess=alu30a3pidthll45yeert145&file_name=JO00001095_45-4_325-330&file_type=r)
- Pattanagul, P., Pinthong, R., & Phianmongkhol, A. (2007). Review of Angkak Production (*Monascus*

- purpureus). *Chiang Mai J. Sci.*, 34(3), 319–328.
- Pattanagul, P., Pinthong, R., Phianmongkhol, A., & Tharatha, S. (2008). Mevinolin, citrinin and pigments of adlay angkak fermented by *Monascus* sp. *International Journal of Food Microbiology*, 126(1), 20–23. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.04.019>
- Pisareva, E. I., & Kujumdzieva, A. V. (2010). Influence of Carbon and Nitrogen Sources on Growth and Pigment Production by *Monascus Pilosus* C1 Strain. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 24(sup1), 501–506. <https://doi.org/10.1080/13102818.2010.10817890>
- Rosenblitt, A., Agosin, E., Delgado, J., & Pérez-Correa, R. (2000). Solid Substrate Fermentation of *Monascus purpureus*: Growth, Carbon Balance, and Consistency Analysis. *Biotechnology Progress*, 16(2), 152–162. <https://doi.org/10.1002/btpr.5420160201>
- Sabater-Vilar, M., Maas, R. F. ., & Fink-Gremmels, J. (1999). Mutagenicity of commercial *Monascus* fermentation products and the role of citrinin contamination. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 444(1), 7–16. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(99\)00095-9](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(99)00095-9)
- Samson, R. A., Hoekstra, E. S., Frisvad, J. C., & Filtenborg, O. (2002). *Introduction to food and airborne fungi* (6ª ed.). Netherland: Centraalbureau Voor Schimmelcultures-Utrecht.
- Shao, Y., Xu, L., & Chen, F. (2011). Genetic diversity analysis of *Monascus* strains using SRAP and ISSR markers. *Mycoscience*, 52(4), 224–233. <https://doi.org/10.1007/S10267-010-0087-Y>
- Shinzato, N., Namihira, T., Tamaki, Y., Tsukahara, M., & Matsui, T. (2009). Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis coupled with microchip electrophoresis for high-resolution identification of *Monascus* strains. *Appl Microbiol Biotechnol*, 82, 1187-. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-1937-4>
- Singgih, M., Saraswaty, V., Ratnaningrum, D., Priatni, S., & Damayanti, S. (2014). The Influence of Temperature and Ethanol Concentration in Monacolin K Extraction from *Monascus* Fermented Rice. *Procedia Chemistry*, 9, 242–247. <https://doi.org/10.1016/j.proche.2014.05.029>
- Species Fungorum. (2016). Species Fungorum. Recuperado 4 de septiembre de 2016, a partir de <http://www.speciesfungorum.org/>
- Srianta, I., Zubaidah, E., Estiasih, T., Yamada, M., & Harijono. (2016). Comparison of *Monascus purpureus* growth, pigment production and composition on different cereal substrates with solid state fermentation. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 7, 181–186. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2016.05.011>
- Stchigel, A. M., Cano, J. F., Abdullah, S. K., & Guarro, J. (2004). No New and interesting species of *Monascus* from soil, with a key to the known species. *Studies in Mycology*, 50, 299–306. Recuperado a partir de [http://www.cbs.knaw.nl/publications/1050/028-New and interesting species of \*Monascus\* from soil, with a key to the known species.pdf](http://www.cbs.knaw.nl/publications/1050/028-New%20and%20interesting%20species%20of%20Monascus%20from%20soil,%20with%20a%20key%20to%20the%20known%20species.pdf)
- Tseng, Y. Y., Chen, M. T., & Lin, C. F. (2000). Growth, pigment production and protease activity of *Monascus purpureus* as affected by salt, sodium nitrite, polyphosphate and various sugars. *Journal of Applied Microbiology*, 88(1), 31–37. Recuperado a partir de <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2672.2000.00821.x/full>
- Tu, C.-Y., Chen, Y.-P., Yu, M.-C., Hwang, I.-E., Wu, D.-Y., & Liaw, L.-L. (2016). Characterization and expression of the antifungal protein from *Monascus pilosus* and its distribution among various *Monascus* species. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 122(1), 27–33. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2015.12.009>
- Vasilyeva, A. A., Chekunova, L. N., Bilanenko, E. N., Kachalkin, A. V., & Polyakova, A. V. (2012). Characterization of the strain *Monascus floricidus* P. F. Cannon & E. L. Barnard, isolated from aviation fuel. *Microbiology*, 81(4), 244–250. <https://doi.org/10.1134/S0026261712010158>
- Vidyalakshmi, R., Paranthaman, R., Murugesh, S., & Singaravadivel, K. (2009). Stimulation of *Monascus* Pigments by Intervention of Different Nitrogen Sources. *Global Journal of*

*Biotechnology & Biochemistry*, 4(1), 25–28. Recuperado a partir de [http://idosi.org/gjbb/gjbb4\(1\)09/4.pdf](http://idosi.org/gjbb/gjbb4(1)09/4.pdf)

- Wong, H.-C., & Bau, Y.-S. (1978). A comparison of conidial and ascospore germination of *Monascus purpureus*. *Transactions of the British Mycological Society*, 70(2), 277–282. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(78\)80042-4](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(78)80042-4)
- Yongsmith, B., Tabloka, W., Yongmanitchai, W., & Bavavoda, R. (1993). Culture conditions for yellow pigment formation by *Monascus* sp. KB 10 grown on cassava medium. *World J Microbiol Biotechnol*, 9(1), 85–90. <https://doi.org/10.1007/BF00656524>
- Yoshizaki, Y., Susuki, T., Takamine, K., Tamaki, H., Ito, K., & Sameshima, Y. (2010). Characterization of glucoamylase and  $\alpha$ -amylase from *Monascus anka*: Enhanced production of  $\alpha$ -amylase in red koji. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 110(6), 670–674. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2010.07.005>
- Zietkiewicz, E., Rafalski, A., & Labuda, D. (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20(2), 176–183. <https://doi.org/10.1006/geno.1994.1151>