

# Les pigments rouges de *Monascus*

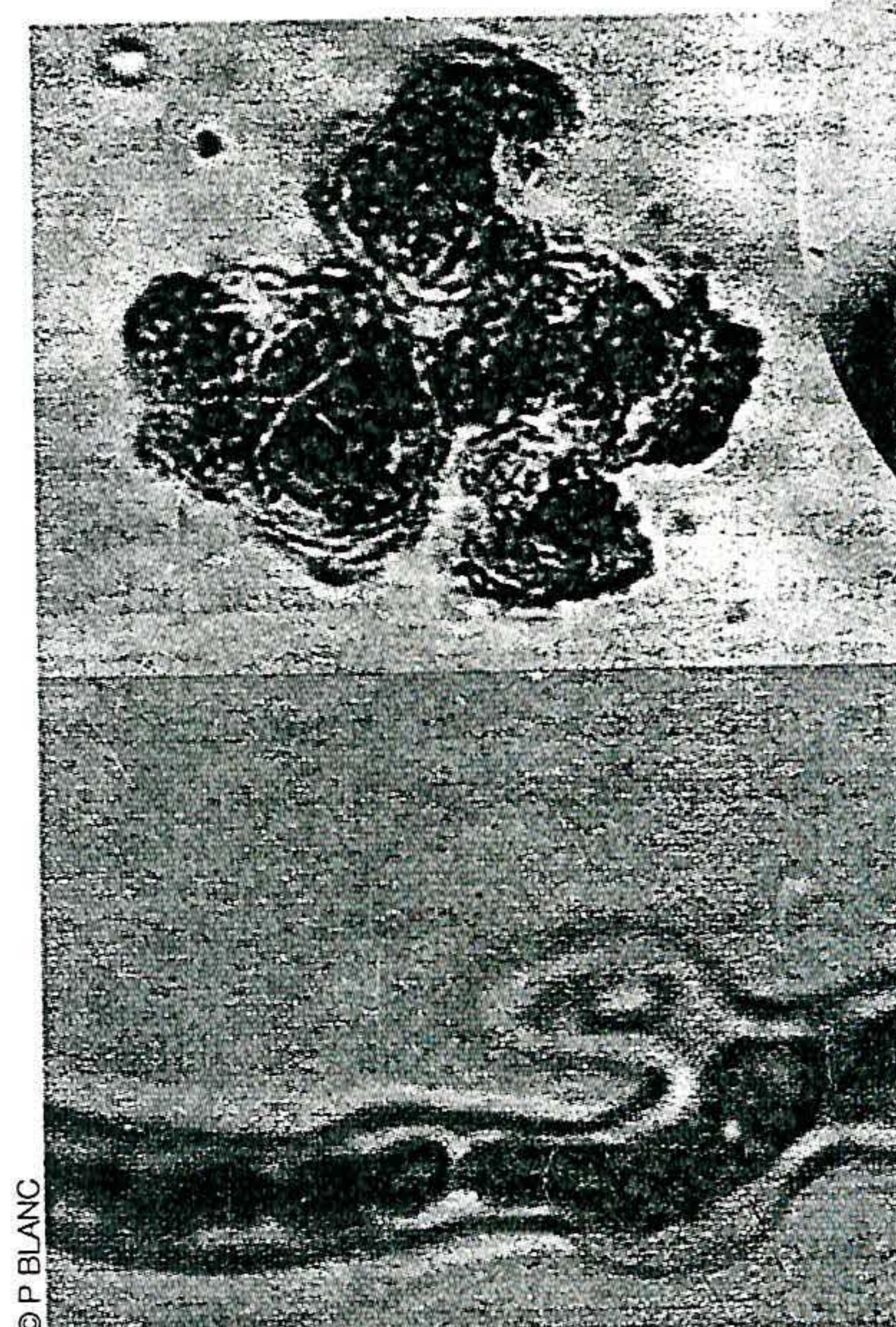
Par Philippe Blanc\*

*En Asie, les champignons filamenteux Monascus sont couramment employés pour produire des colorants rouges alimentaires. Certaines souches sécrètent cependant une substance toxique, la citrinine. La mise au point récente d'une méthode permettant d'éviter la synthèse de ce composé toxique pourrait permettre leur utilisation en Europe et aux États-Unis.*

\* Institut national des sciences appliquées (Insa), Département de génie biochimique et alimentaire, UMR-CNRS 5504, Complexe scientifique de Rangueil, 37077 Toulouse cedex 04.

La coloration des aliments, comme celle des textiles, remonte aux temps les plus anciens. Durant des siècles, les seuls colorants disponibles ont été d'origine animale (carmin), végétale (xanthophylles, anthocyanines, curcumine...) ou minérale (oxydes de fer...). En 1856, le chimiste britannique William Perkin obtint, en oxydant de l'aniline, produit de distillation de l'indigo,

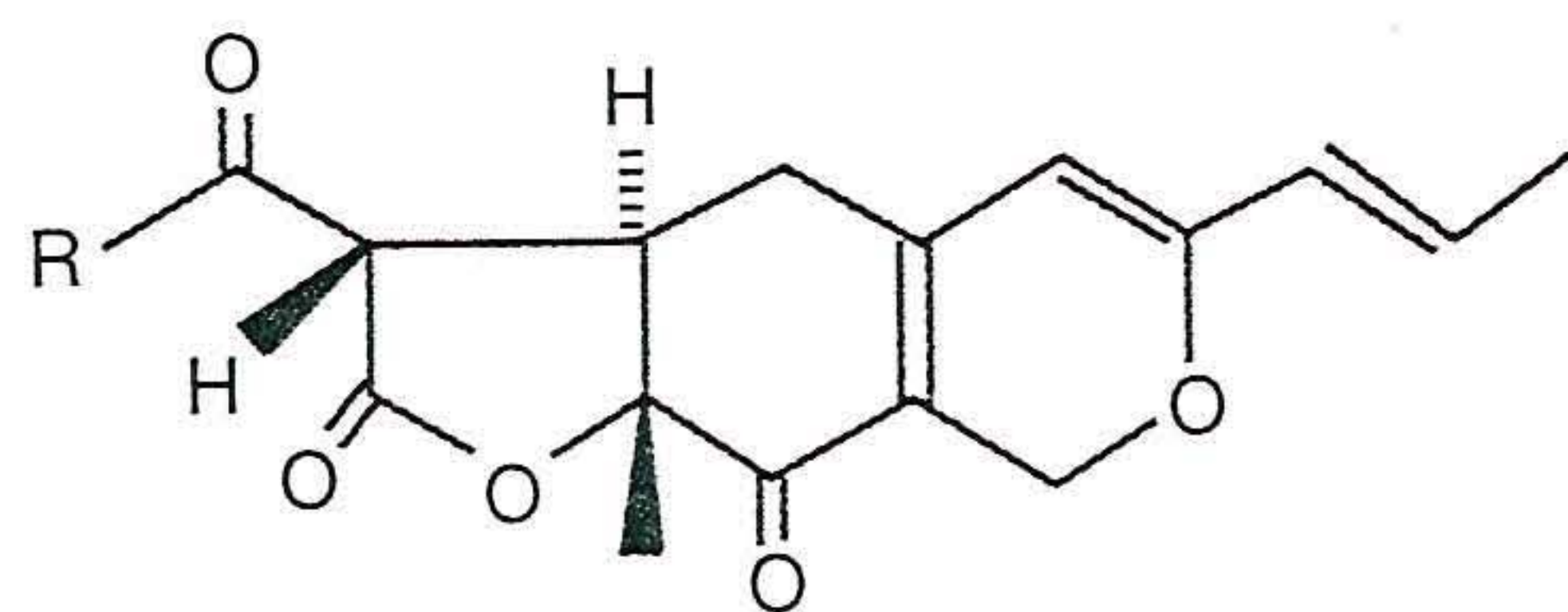
un colorant mauve (la mauvéine) capable de teindre la soie. À partir de cette date, les colorants naturels ont progressivement été remplacés par des matières de synthèse. Actuellement, on assiste à un renversement de tendance : la coloration alimentaire est jugée indispensable, étant donné son importance pour la valeur organoleptique des aliments ; mais les groupes industriels se tournent de



Mycélium de *Monascus* au microscope et en boîte de Petri.

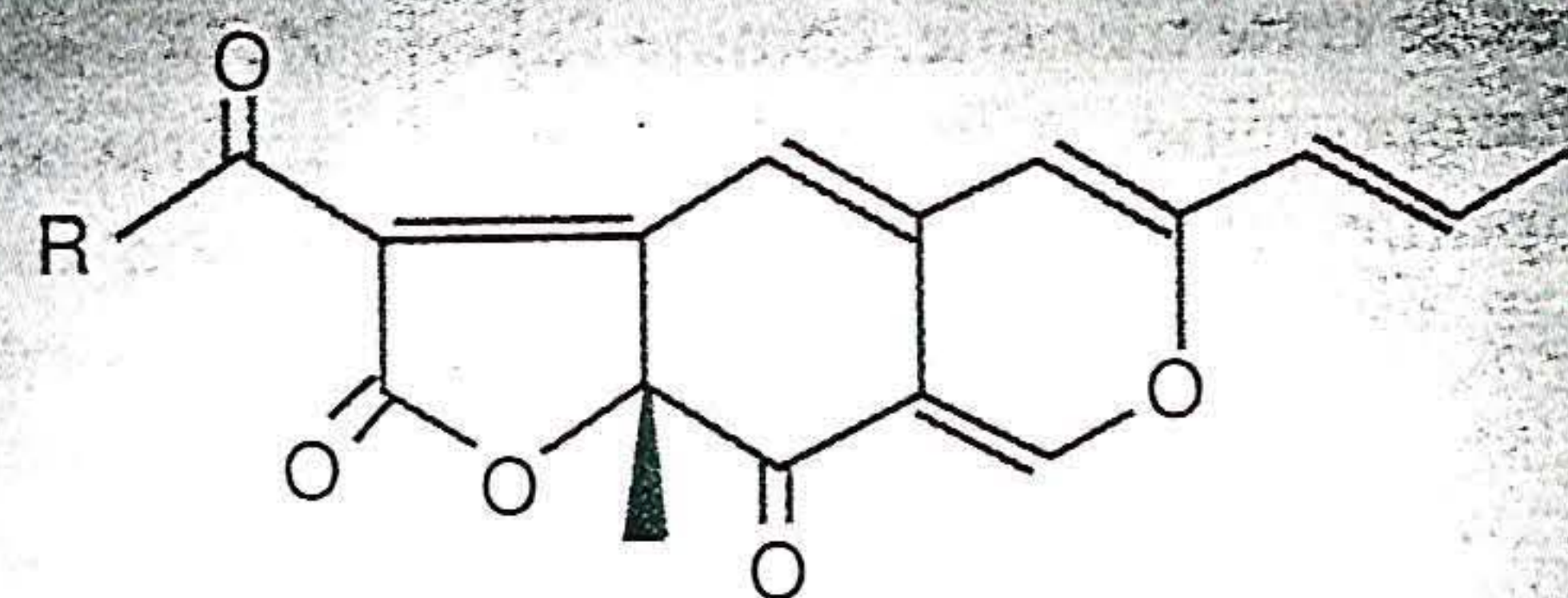
plus en plus vers les substances naturelles, car la liste des colorants organiques de synthèse autorisés tend à diminuer, sous la pression de la réglementation et des consommateurs (voir les tableaux p. 36).

Depuis l'Antiquité, les végétaux ont largement été exploités pour la



Jaune R

**Monascine**  $n\text{-C}_5\text{H}_{11}$   
**Ankaflavine**  $n\text{-C}_7\text{H}_{15}$

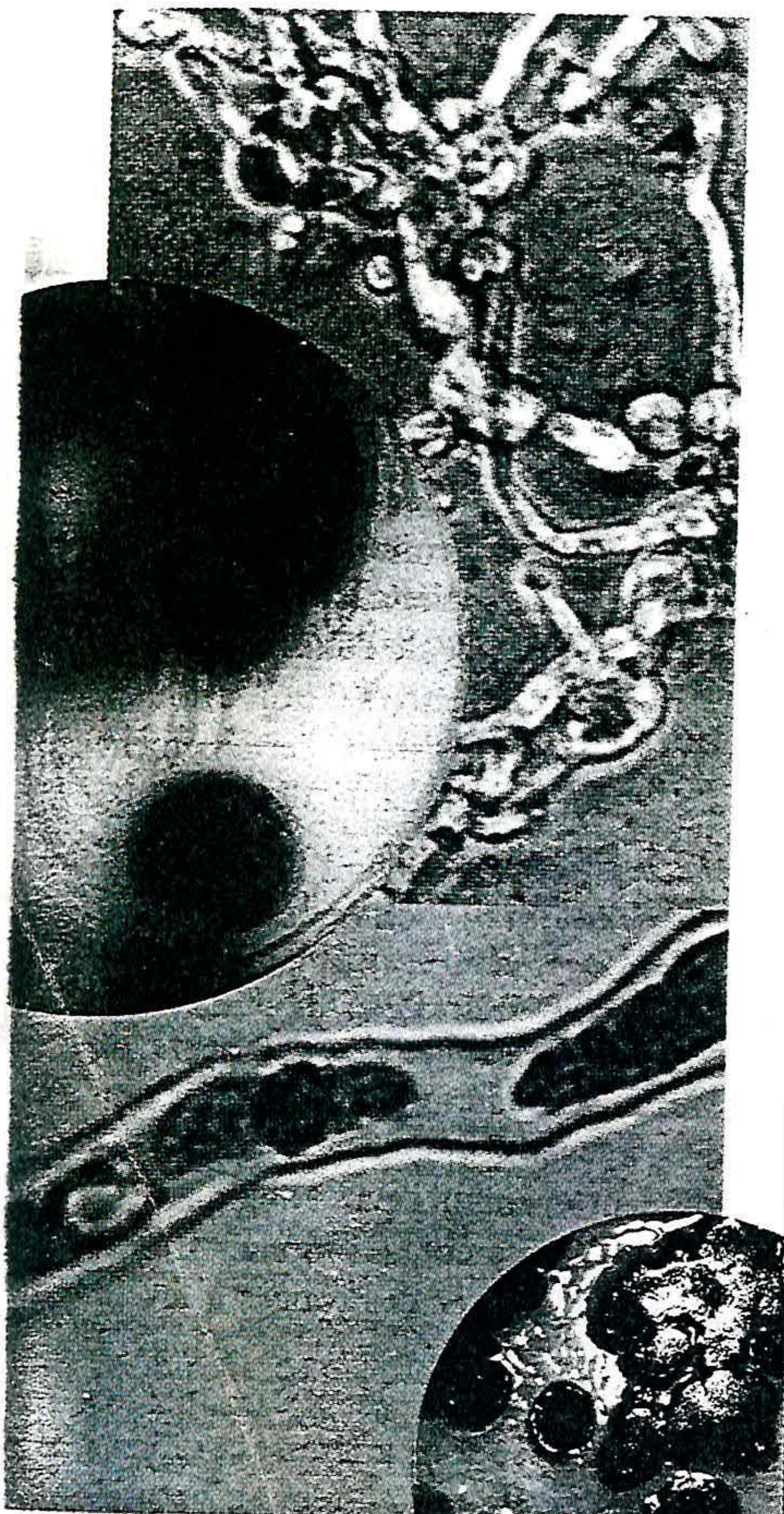


Orange R

**Rubropunctatine**  $n\text{-C}_5\text{H}_{11}$   
**Monascorubrine**  $n\text{-C}_5\text{H}_{15}$



coloration alimentaire et textile, mais leur productivité est souvent faible. De plus, leur utilisation pose des problèmes de récolte, de culture et de purification, souvent difficiles à résoudre. Une solution est la culture *in vitro* de cellules végétales ; ce procédé a été exploité industriellement,



notamment au Japon, pour produire la shikonine, pigment rouge utilisé en cosmétologie, à partir d'une herbe dont les racines sont traditionnellement utilisées en médecine chinoise, *Lithospermum erythrorhizon*.

Une autre voie plus prometteuse consiste à exploiter les champignons filamenteux, en particulier les

micromycètes pigmentogènes, que l'on peut assez facilement cultiver industriellement. *Monascus* fait partie de ceux-là. Cette moisissure naturelle est peu connue en Europe, bien qu'elle ait été découverte sur la pomme de terre par le botaniste français Philippe van Tieghem dans les années 1880. Aujourd'hui, elle est surtout connue en tant que moisissure du riz (*Monascus purpureus*, *M. ruber* et *M. pilosus*). Elle élabore, au cours de sa croissance, des pigments rouges qui, en Asie, sont largement utilisés sous le nom d'« Anka » (ou Ang-Kak, c'est-à-dire riz rouge) pour colorer les charcuteries, la viande, le vin de riz, le fromage de soja, le poisson ou le ketchup. Traditionnellement, ces pigments sont produits industriellement en Chine par *Monascus purpureus* et *M. ruber*, grâce à la fermentation de riz en milieu solide (1). De nombreux brevets ont été déposés sur des procédés de production de ces pigments, par exemple par Nestlé, dans les années 1980, Quaker Oat Company (Chica-

go, Illinois), Shell, et aussi par les entreprises japonaises Yaegaki Bio-Industry Inc et Riken Vitamie Co. Ltd. En 1992, la consommation annuelle au Japon (le plus fort consommateur après la Chine) dépassait les 600 tonnes, pour des ventes s'élevant à 1 440 millions de yens.

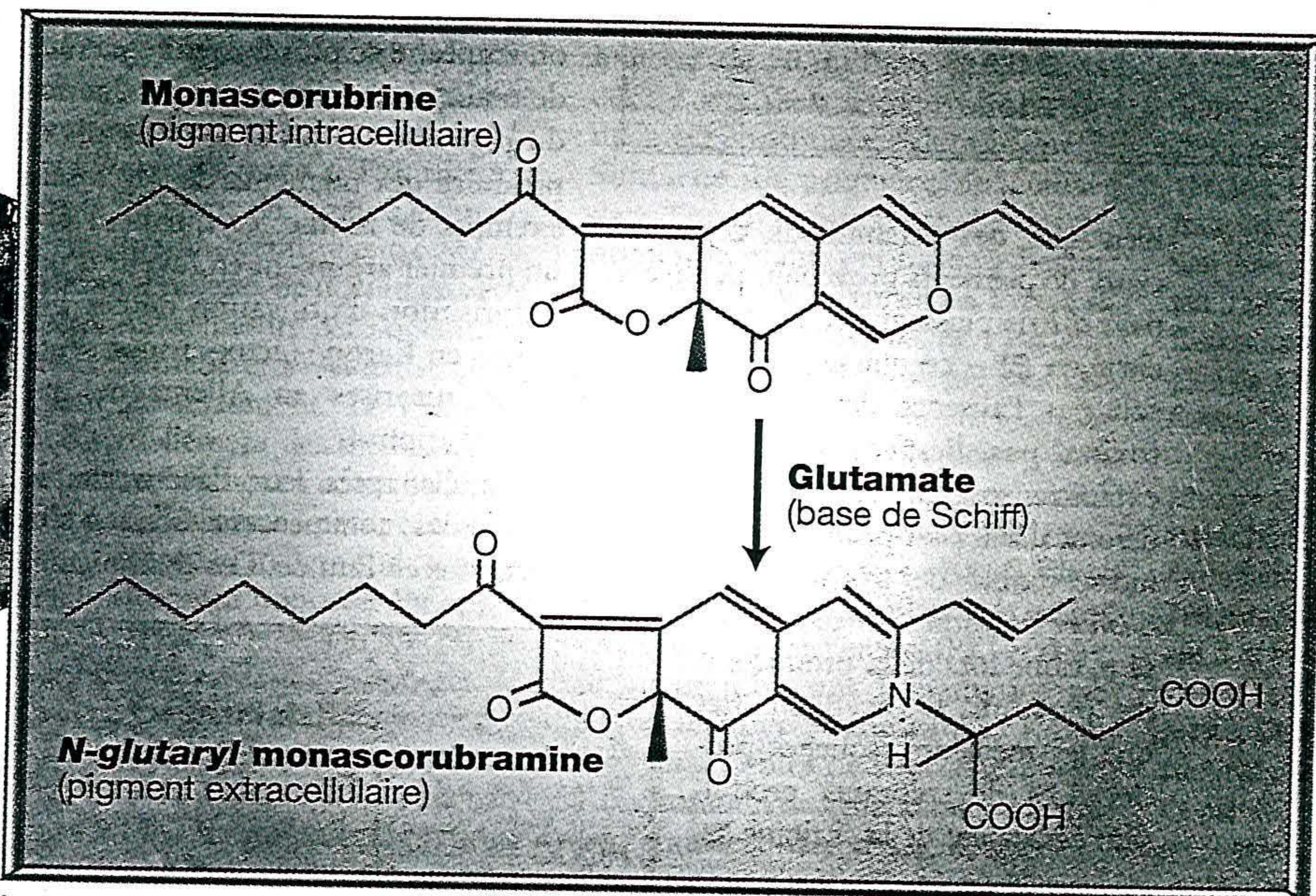
### > Une substance toxique : la citrinine

Malgré cet intérêt, ces pigments ne sont autorisés ni dans l'Union européenne, ni aux États-Unis, par manque d'études toxicologiques. De plus, la production de pigments rouges par les *Monascus* présente un défaut : elle est très souvent associée à celle d'une substance antibiotique, la monascidine A, dont nous avons montré en 1995, à l'Insa de Toulouse, qu'il s'agit d'une molécule toxique connue sous le nom de citrinine (2). Par exemple, sur des cellules hépatiques de fœtus de rats, la citrinine a un effet comparable à celui de l'acide laccaïque, un agent mutagène (3).

(1) A. Durand (1998) *Biofutur* 181, 41-43

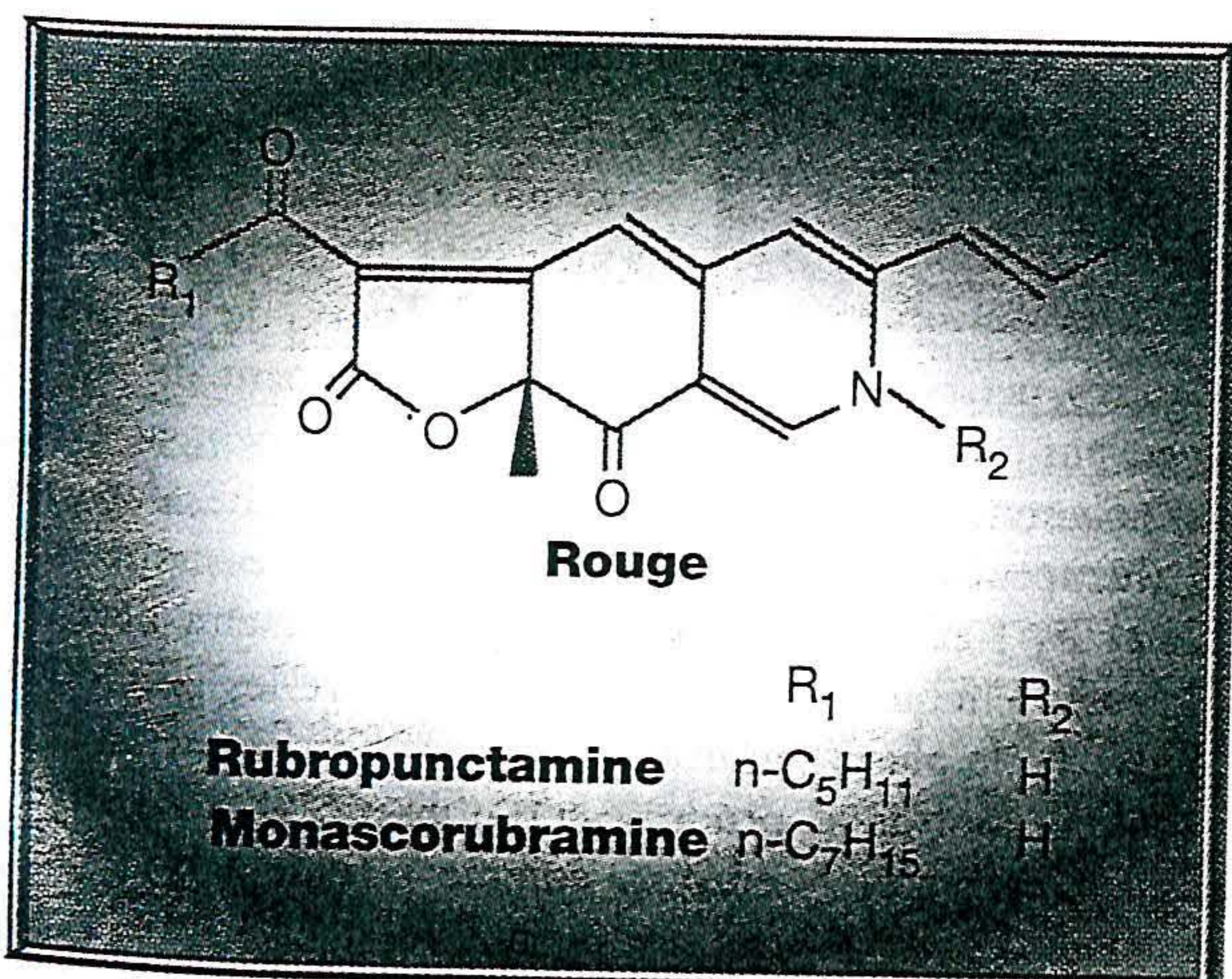
(2) P.J. Blanc et al. (1995) *Int. J. Food Microbiol.* 27, 201-213.

(3) F. Sako et al. (1983) *Chem. Biol. Interactions* 44, 17-26.



Les pigments des *Monascus* correspondent à six molécules différentes, dont deux seulement sont rouges : la rubropunctamine et la monascorubramine. Les autres sont de couleur jaune

(ankaflavine et monascine) ou orange (rubropunctatine et monascorubrine) et ne sont pas utilisées en alimentation, leur quantité intracellulaire étant trop faible par rapport à la quantité extracellulaire – ce sont, de plus, des pigments hydrophobes. Les six molécules diffèrent par leur degré d'insaturation, leurs fonctions auxochromes (oxygène et amine) et la taille de leurs chaînes aliphatiques. Les pigments orange (monascorubrine et rubropunctatine) proviennent directement du métabolisme secondaire du champignon, alors que les pigments jaunes (ankaflavine et monascine) et les pigments rouges (monascorubramine et rubropunctamine) sont des métabolites issus d'une réaction de réduction des pigments orange pour les pigments jaunes, et d'une réaction d'amination par l'ammoniaque pour les pigments rouges (1). Ces pigments sont intracellulaires, peu solubles dans l'eau, sensibles à la chaleur, instables aux pH extrêmes et à la lumière. Mais ce ne sont pas eux qui sont utilisés comme colorants. En effet, le champignon a la faculté, en les liant à un groupe aminé, de les rendre hydrosolubles et de les excréter dans le milieu de culture (riz ou milieu liquide) (voir ci-dessus)





... Celui-ci induit une augmentation de la  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase, une enzyme qui intervient dans le transport des acides aminés, et dont l'induction par divers composés toxiques (comme l'éthanol, par exemple) est liée à une activation de la carcinogénèse (4).

**Les colorants synthétiques autorisés dans l'Union européenne et aux États-Unis**

Colorants synthétiques	UE	États-Unis
Bleu brillant FCF		Bleu n° 1
Bleu parenté V	E 131	
Carmin indigo	E 132	Bleu n° 2
Vert acide brillant	E 142	
Fast green FCF		Vert n° 3
Tartrazine	E 102	Jaune n° 5
Jaune de quinoléine	E 104	
Jaune orange S	E 110	Jaune n° 6
Jaune citron		Jaune citron n° 2
Orange B		Orange b
Amarante	E 123	
Érythrosine	E 127	
Rouge allura		Rouge n° 40
Azorubine (carmoisine)	E 122	
Rouge cochenille	E 124	
Pigment rubis	E 180	
Noir brillant	E 151	

**Les colorants naturels disponibles sur le marché mondial**

Colorants naturels	Code
<b>Jaune</b>	
Curcumine	E 100
Riboflavine	E 101
Annato	E 160
Xanthophylles	E 161
<b>Rouge</b>	
Acide carminique	E 120
Rouge de betterave	E 162
Anthocyanines	E 163
<b>Vert</b>	
Chlorophylle	E 140
Chlorophyllines	E 141
Vert S	E 142
<b>Brun</b>	
Caramel ammoniacal	E 150
Caramel sulfite d'ammonium	E 150
<b>Noir</b>	
Carbo medicinalis	E 153

importantes applications industrielles de *Monascus* pour la fermentation en milieu liquide. Les monacolines inhibent spécifiquement la HMG-CoA réductase, enzyme clé dans la biosynthèse du cholestérol. Le taux de cholestérol dans le plasma d'animaux traités oralement ou par intraveineuse diminue de 10 à 20 % par rapport à des animaux non traités. Sous forme de complément diététique hypocholestérolémiant, la monacoline est vendue aux États-Unis sous le nom de Cholestin® par la société Pharmanex (Simi Valley, Californie) (9) et sous le nom de Wenstardin® en Chine par la société WBL (issue de l'université de Pékin).

Les perspectives d'utilisation en Europe existent certainement dans le domaine des aliments

présence de proline, d'arginine ou de glycine, et nulle en présence d'histidine ou de tryptophane (6). En supprimant l'acide glutamique du milieu, on empêche de plus la synthèse d'acide malique, qui inhibe la production du pigment. Ce procédé a permis de produire des pigments de *Monascus* exempts de toxine, ce qui peut être un premier argument en faveur d'une autorisation d'utilisation de ces pigments en Europe (ceux-ci sont seulement autorisés en Allemagne, par «dérogação»).

Un siècle après leur découverte, les *Monascus* commencent donc à être reconnus en Europe. Ces champignons

santé, les «aliments» ou «nutraceutiques». Mais là encore, les industriels seront confrontés à un problème d'homologation par l'Union européenne. En Chine, les pigments de *Monascus* sont aussi utilisés dans l'industrie cosmétique ; par exemple des pigments produits par Ningxia R.D. Natural Pigment (Ningxia, Chine) servent à colorer des rouges à lèvres. À l'Université Kasetsart de Bangkok (Thaïlande), c'est au textile que les chercheurs se sont intéressés ; grâce à *Monascus*, ils ont pu teindre naturellement en rouge et jaune de la soie et de la laine. Aux Pays-Bas, à Wageningen, l'institut néerlandais de recherche agrotechnologique (ATO/DLO) cherche plus particulièrement à teindre grâce à *Monascus* des matériaux biodégradables, comme les emballages en PHB/PHV.

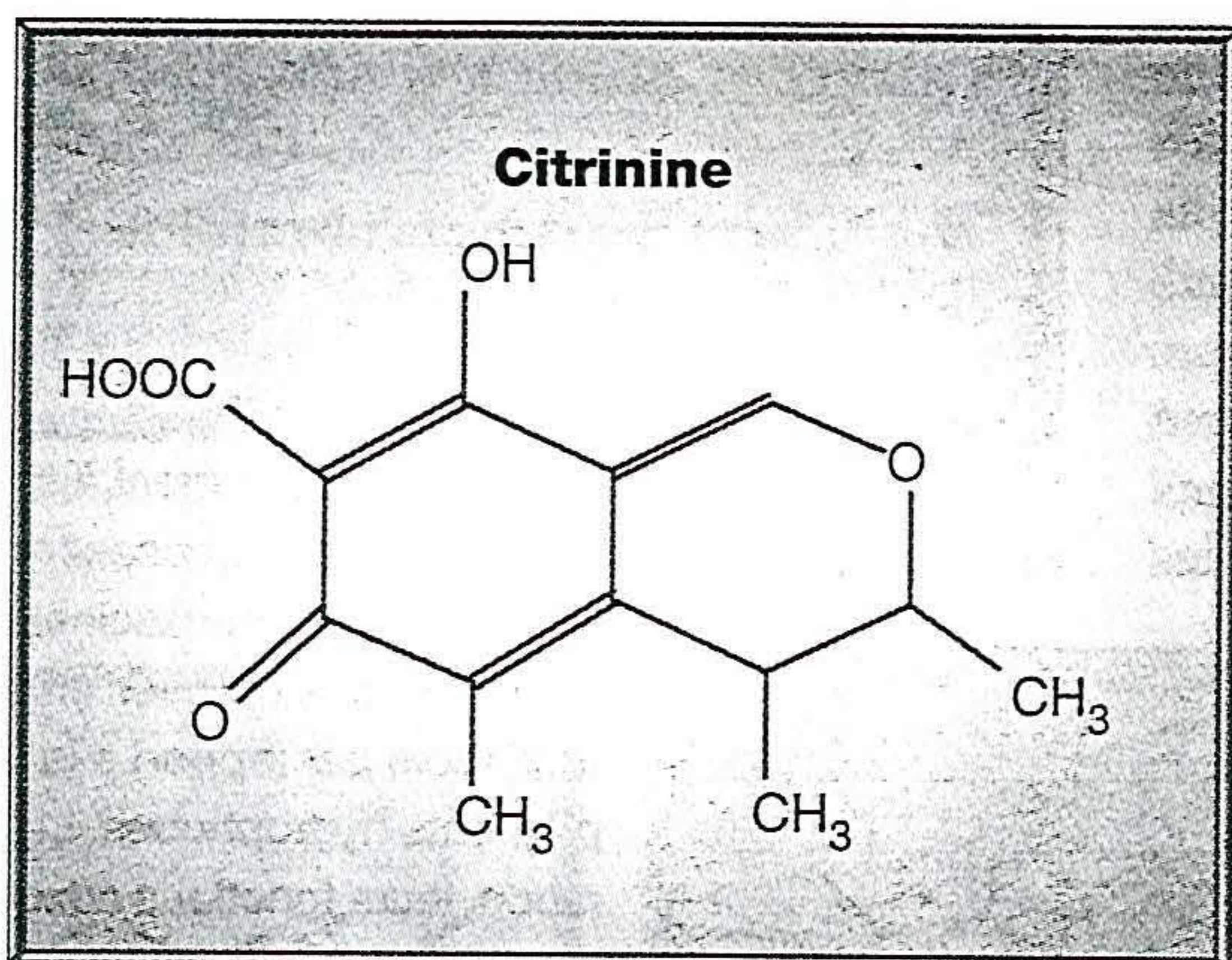
D'un récent symposium sur la culture et les applications de *Monascus* (8-10 juillet 1998, à Toulouse), auquel ont participé une trentaine de spécialistes du monde entier, représentant seize nationalités, est ressortie la nécessité d'une évaluation globale du taux de citrinine

des échantillons provenant de nombreux pays. Un rapprochement avec la Commission européenne, dans le cadre du 5<sup>e</sup> programme cadre de recherche et développement, devrait permettre de connaître les prérequis indispensables à l'autorisation de produire et d'utiliser ces colorants en Europe, comme cela se fait depuis des siècles en Asie.

Bien que des échantillons commerciaux de pigments provenant de divers pays d'Asie puissent être dépourvus de citrinine (5) – ce qui peut s'expliquer soit par l'absence de production de toxine par l'espèce de *Monascus* exploitée, soit par des phénomènes de détoxification post-production – il est indispensable de trouver un moyen d'éviter la synthèse de ce composé toxique lors de la production des pigments. Il s'avère en effet que les meilleures souches productrices de colorants produisent également de la citrinine (6).

**> Des ressources pharmaceutiques**

Afin d'éviter la formation de ce composé, nous avons cherché à trouver une méthode contrôlant sa biosynthèse. Le décryptage des voies métaboliques a montré que la production de citrinine dépend fortement de la présence de certains acides aminés dans le milieu de culture. En cultivant une souche de *Monascus ruber* hyperproductrice de citrinine sur un milieu liquide contenant du glucose et divers acides aminés, la production du composé toxique est apparue maximale en présence d'acide glutamique ou d'alanine, forte en



offrent par ailleurs d'autres perspectives intéressantes. Ils peuvent produire, comme d'autres champignons, des substances à vocation thérapeutique, telles que les monacolines K, J et L, dont l'activité hypocholestérolémique est attestée (7, 8). Le dérivé K, le plus actif, est plus connu sous le nom de mévinoline, ou lovastatine. La production de monacolines est l'une des plus

(4) U. Boelsterli (1979) *Trends Pharmacol. Sci.* 10, 47-49.

(5) J. Fink-Gremmels, M. Sabater Vila (1998) *Pharmacological and toxicological aspects of Monascus and the role of citrinin*. Proceedings of the symposium on *Monascus* culture and applications. Toulouse, France, 8-10 juillet 1998.

(6) P.J. Blanc et al. (1998) *Control of the production of citrinin by Monascus*. Proceedings of the symposium on *Monascus* culture and applications. Toulouse, France, 8-10 juillet 1998.

(7) R.J. Havel et al. (1987) *Ann. Intern. Med.* 107, 609-615.

(8) A. Endo, K. Hasumi (1989) *Adv. Enzyme Regul.* 28, 53-64.

(9) www.pharmanex.com/