



Passion for
FLAVOUR™



Power of
PEOPLE™



Taste you
TRUST™



Driven to
INNOVATE



Purpose-led
PERFORMANCE

**Estratti di riso rosso Fermentato (*Monascus purpureus*):
parametri di controllo della qualità e tecniche analitiche
per la rilevazione di eventuali adulterazioni**

SCIENTIFIC OPINION

Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to monacolin K from red yeast rice and maintenance of normal blood LDL-cholesterol concentrations (ID 1648, 1700) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006¹

EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA)^{2, 3}

European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy

SUMMARY

Following a request from the European Commission, the Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies was asked to provide a scientific opinion on a list of health claims pursuant to Article 13 of Regulation (EC) No 1924/2006. This opinion addresses the scientific substantiation of health claims in relation to monacolin K from red yeast rice and maintenance of normal blood LDL-cholesterol concentrations. The scientific substantiation is based on the information provided by the Member States in the consolidated list of Article 13 health claims and references that EFSA has received from Member States or directly from stakeholders.

The food that is the subject of the health claim is red yeast rice (i.e. rice fermented with the red yeast *Monascus purpureus*). The Panel considers that, whereas red yeast rice is not sufficiently characterised in relation to the claimed effect, the food constituent, monacolin K from red yeast rice, is sufficiently characterised.

The Panel considers that in order to obtain the claimed effect, 10 mg of monacolin K from fermented red yeast rice preparations should be consumed daily. The target population is adults in the general population.

Per il claim salutistico quali parametri devo garantire secondo il parere EFSA ?

- Fermentazione da *Monascus Purpureus*
- Substrato di fermentazione : Riso
- Dosaggio di 10 mg/giorno di Monakolina K

ALTRI PARAMETRI DI QUALITA' FONDAMENTALI

Parametri microbiologici

CBT < 50.000 ufc/g *

Muffe e lieviti < 500 ufc/g

Batteri bile tolleranti Gram (-) < 100 ufc/g

E.Coli assente in 1g

Salmonella assente in 25 g

Radioattività < 600 Beq/Kg Reg. CE 1048/2009

Irraggiamento : prodotto non irraggiato * Dir. 1999/2/CE

Metalli Pesanti Reg. CE 629/2008

Pb < 3 ppm

Cd < 1 ppm

Hg < 0,1 ppm

As < 1 ppm

*parametro ad alto rischio

ALTRI PARAMETRI DI QUALITA' FONDAMENTALI

Solventi residui

Conformità Dir. CE 2009/32

Citrinina < 50 ppb*

Aflatossine totali < 10 ppb

Conformità Reg. CE 1881/2006

API Reg. CE 2015/1933

Pesticidi

Conformità Reg. CE 396/2005

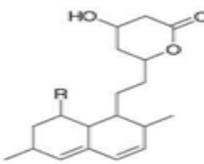
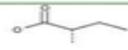
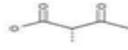
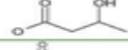
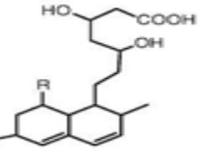
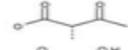
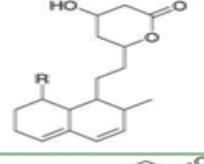
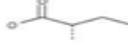
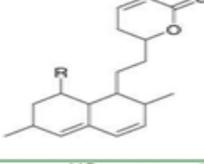
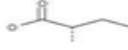
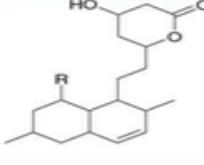
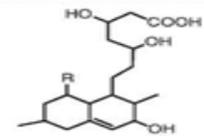
Allergeni

Conformità Dir. CE 2007/68

Glutine *

*parametro ad alto rischio

COSTITUENTI PRINCIPALI ESTRATTI RYR

Structure	Name	R	MW	UV (λ_{max})	Ref.
	1. Monacolin K (MK)		404	230, 237, 246	10-12, 20
	2. Monacolin J (MJ)	OH	320	230, 237, 247	13
	3. Monacolin L (ML)	H	304	230, 237, 247	13
	4. Monacolin X (MX)		418	230, 237, 247	14
	5. Monacolin M (MM)		406		15
	1a. MK acid form (MKA)		422		25, 26
	2a. MJ acid form (MJA)	OH	338		
	3a. ML acid form (MLA)	H	322		
	4a. MX acid form (MXA)		436		
	5a. MM acid form (MMA)		424		
	6. Compactin (P1)		390	230, 237, 247	8, 9
	7. Dehydromonacolin K (DMK)		386		6
	8. Dihydromonacolin L (DML)	H	306		14
	9. 3 α -hydroxy-3,5-dihydromonacolin L (HDML)	H	340		23

Controllo del Titolo di Monacolina K

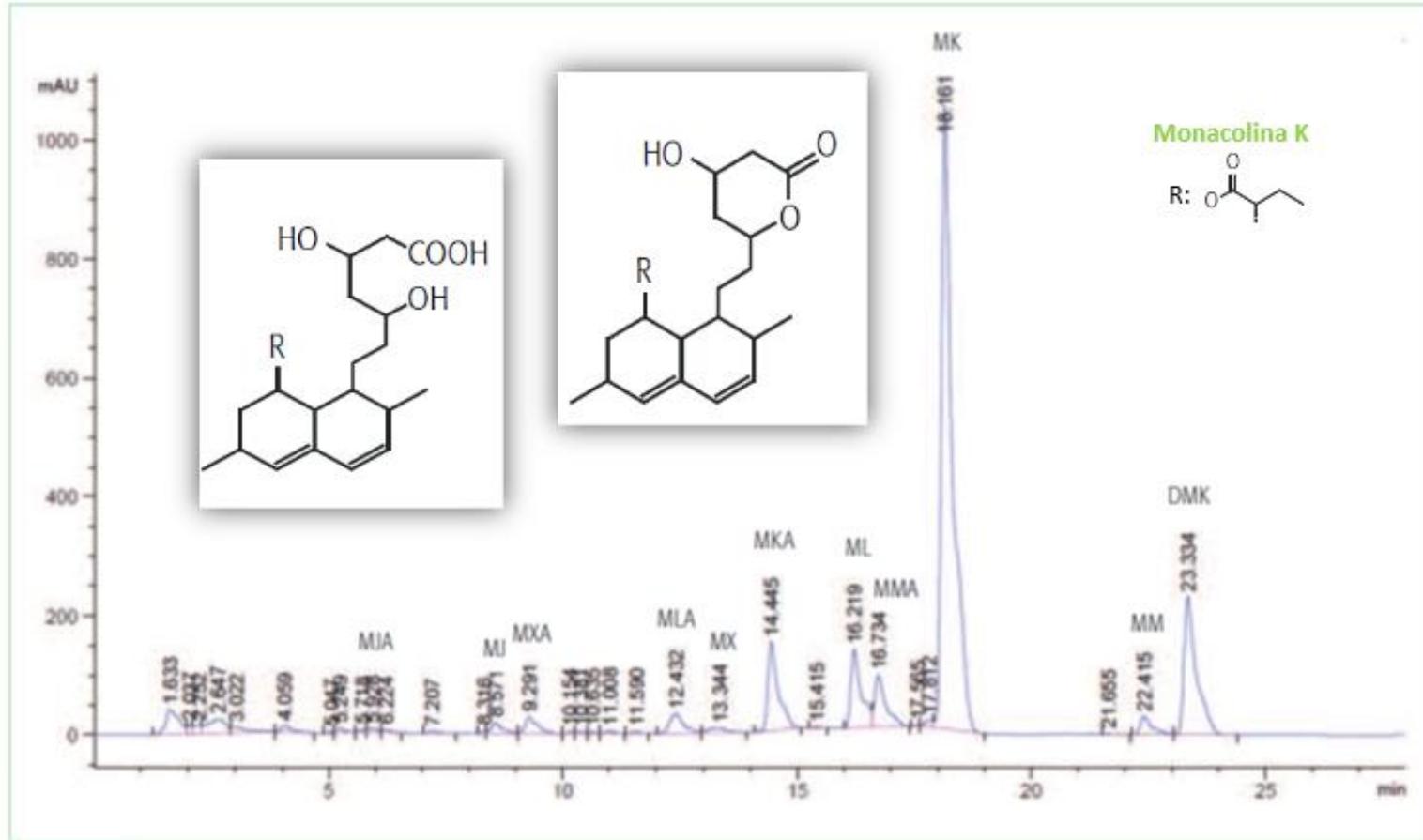


Figure 3 *Monascus* extract titred as 1.5% of monacolin K. HPLC analysis shows that monacolins K and KA combined constitute about 70% of the total monacolin content of the extract.

Possibili Adulterazioni

- ❖ Aggiunta **totale di lovastatina** (naturale da *Aspergillus* o sintetica) a carrier e pigmenti rossi (da *Monascus* o da altre fonti)
- ❖ Aggiunta **parziale di lovastatina** (naturale da *Aspergillus* o sintetica) ad estratti di Riso Rosso Fermentato da *Monascus* – substrato **riso**
- ❖ Aggiunta **parziale di lovastatina** (naturale da *Aspergillus* o sintetica) ad estratti di Riso Rosso Fermentato da *Monascus* – substrato **diverso da solo riso**
- ❖ Aggiunta **parziale di lovastatina** (naturale da *Aspergillus* o sintetica) ad estratti di Riso Rosso Fermentato da **altro agente fermentativo** – substrato **riso**
- ❖ Aggiunta **parziale di lovastatina** (naturale da *Aspergillus* o sintetica) ad estratti di Riso Rosso Fermentato da **altro agente fermentativo** – substrato **diverso da solo riso**

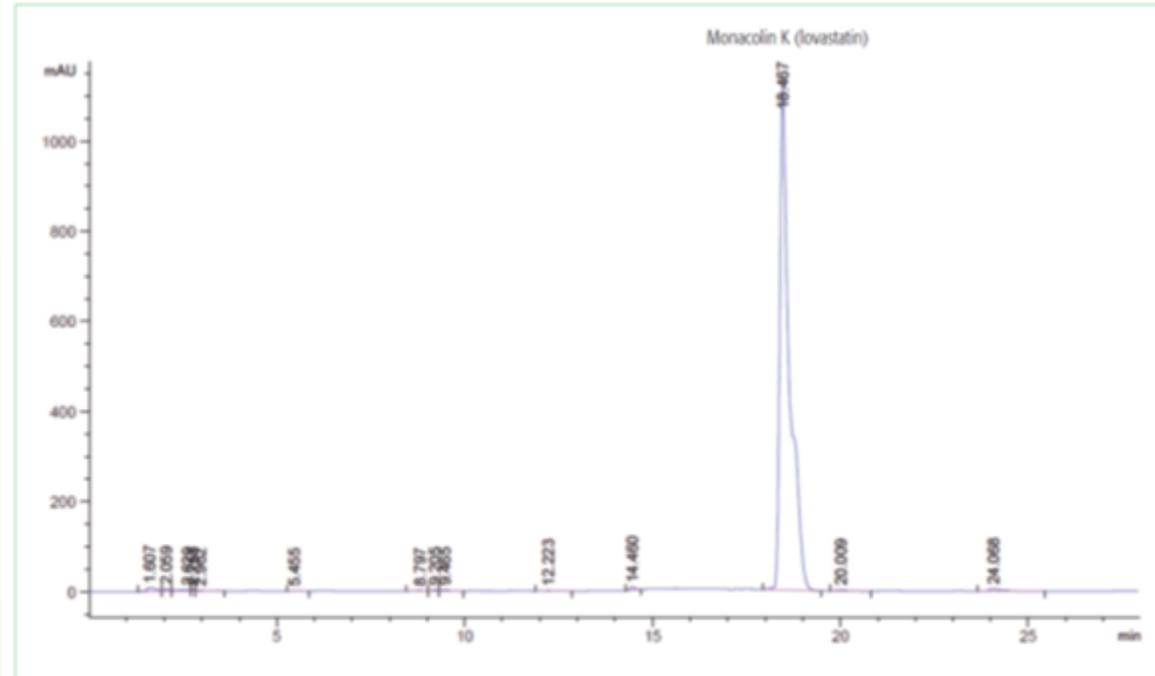


Figure 2 HPLC analysis of a surely adulterated *Monascus* extract shows that the only visible peak corresponds to lovastatin; no other peaks are produced

Linea guida analitica – Il protocollo integrato



Titolo monacolina K totale del campione e presenza di monacoline secondarie

Provenienza della monacolina K presente, se naturale da riso o non

Materiale genetico fungino

Analisi dei pigmenti

1. Titolo in monacolina K totale del campione e presenza di monacoline secondarie

ANALISI HPLC DELLA MONACOLINA K E DELLE MONACOLINE SECONDARIE:

- Solubilizzazione dei campioni in MeOH
- Analisi cromatografica mediante HPLC/DAD su colonna RP C18, λ 250 nm
- Calibrazione con STD interno (lovastatina o mevinolina Sigma-Aldrich)
- Titolazione riferita alla Monacolina K Totale: forma acida + forma lattonica

Campione sospetto se **$0,15 < \text{MKA}:\text{MKtot} < 0,30$** e **$0,05 < \text{MKtot}:\text{Msec} < 0,15$**

Campione NON autentico **$\text{MKA}:\text{MKtot} < 0,15$** e **$\text{MKtot}:\text{Msec} < 0,05$**

2. Provenienza della monacolina K presente, se naturale da riso o non

ANALISI ISOTOPICA DELLA MONACOLINA K:

- Estrazione della monacolina K da campioni di Riso Rosso Fermentato (Li et al. 2004)
- Isolamento della molecola tramite HPLC preparativo
- Liofilizzazione
- Analisi con spettrometria di massa isotopica
- Determinazione del rapporto $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ (espresso come $\delta^{13}\text{C}$)

Campione NON autentico se il $\delta^{13}\text{C} < -28,3\text{‰}$ (Perini et al., 2017)

3. Materiale genetico fungino

ANALISI DEL DNA FUNGINO:

- Estrazione ed amplificazione del campione con kit e primer specifici
- Valutazione positività su gel elettroforetico di agarosio
- Sequenziamento ed identificazione
- Riconoscimento per confronto con database GeneBank

Campione NON autentico soltanto se presente materiale genetico di **altri agenti fermentanti**

4. Analisi dei pigmenti

ANALISI SPETTROFOTOMETRICA DEI PIGMENTI:

- Pigmenti gialli: max di assorbimento a 405 nm
- Pigmenti rossi: max di assorbimento a 510 nm
- I rapporti di assorbanza tra i max è generalmente compreso tra 0,75 e 1,40

Campione con scarsa presenza di pigmenti: $0,15 < \text{Abs} < 0,20$

Campione con molto scarsa presenza di pigmenti: $\text{Abs} < 0,15 \rightarrow$ BASSA QUALITA'

Protocollo integrato - Limiti di identificazione

Titolo monacolina K totale del campione e presenza di monacoline secondarie



non permette di identificare parziali aggiunte di lovastatina tali da mantenere i rapporti con le altre monacoline nell'intervallo di valutazione di autenticità.

Provenienza della monacolina K presente, se naturale da riso o non



l'analisi isotopica della monacolina K non permette di identificare adulterazioni da lovastatina prodotta da altri ceppi fermentativi (anche Aspergillus) su substrato riso.

Materiale genetico fungino



l'analisi rileva soltanto possibili adulterazioni da altri agenti fermentanti purché il materiale genetico non risulti denaturato durante processi industriali post fermentazione. L'assenza di DNA di Monascus non implica la non genuinità del campione.

Analisi dei pigmenti



la sola analisi non identifica aggiunte anche grossolane di lovastatina.



Passion for
FLAVOUR™



Power of
PEOPLE™



Taste you
TRUST™



Driven to
INNOVATE



Purpose-led
PERFORMANCE

GRAZIE



GIOTTI
Your Natural Flavor House

Controllo dei Parametri ad Alto Rischio

Determinazione del trattamento con **Radiazioni Ionizzanti**:

✓ **METODO PSL: FOTOLUMINESCENZA STIMOLATA:**

Stimolazione con radiazioni elettromagnetiche e conseguente emissione di luminescenza fotostimolata (PSL). La misurazione del segnale PSL può essere:

- ✓ **NEGATIVO**: improbabile sia stato sottoposto a radiazioni ionizzanti.
- ✓ **INTERMEDIO**: non permette di convalidare direttamente lo stato di irradiazione. E' pertanto consigliata la determinazione mediante tecnica di analisi TL.
- ✓ **POSITIVO**: fortemente indicativi di un campione irradiato.

✓ **METODO TL: TERMOLUMINESCENZA:**

Estrazione dei minerali ed irradiazione degli stessi con ^{60}Co . Viene effettuata una prima lettura TL (Glow1) e una seconda lettura TL (Glow2). Per l'identificazione del campione ci si basa, sull'osservazione del rapporto fra le intensità delle due curve G1/G2, calcolati nell'intervallo 150-250°C.

- ✓ **IRRADIATO**
 - a) rapporto $G1/G2 > 0,1$
 - b) presenza di un picco TL nella regione 150-250°C
- ✓ **NON IRRADIATO**
 - a) rapporto $G1/G2 < 0,1$
 - b) picco non presente nella regione 150-250°C
- ✓ **CONTENENTE UNO O PIU' INGREDIENTI IRRADIATI**
 - a) rapporto $G1/G2 < 0,1$
 - b) presenza di un picco TL nella regione 150-250°C.