

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

285 721

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **970-98**

(22) Přihlášeno: **30. 03. 98**

(40) Zveřejněno: **13. 10. 99**
(Věstník č. 10/99)

(47) Uděleno: **23. 08. 99**

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: **13. 10. 99**
(Věstník č. 10/99)

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.⁶:

C 12 N 1/14

C 09 B 61/00

(73) Majitel patentu:

SARDARYAN EDUARD Dr., Pardubice, CZ;

(72) Původce vynálezu:

Sardaryan Eduard Dr., Pardubice, CZ;

(74) Zástupce:

Jírotková Ivana Ing., Nad Štolou 12, Praha
7, 17000;

(54) Název vynálezu:

**Kmen mikroorganismu Penicillium
oxalicum var. Armeniaca a jeho použití**

(57) Anotace:

Kmen mikroorganismu Penicillium oxalicum var.
Armeniaca CCM 8242 produkuje červené barvivo,
shodné s kyselinou karmínovou, použitelné zejména
jako potravinářské nebo kosmetické barvivo.

CZ 285 721 B6

Kmen mikroorganismu *Penicillium oxalicum* var. *Armeniaca* a jeho použitíOblast techniky

5

Vynález se týká nového kmene plísně s vlastností produkovat červené barvivo, které může být použito jako barvivo v potravinářském a kosmetickém průmyslu.

10 Dosavadní stav techniky

V potravinářském a kosmetickém průmyslu existuje potřeba barviv, dobře rozpustných v komponentách příslušných produktů, jejichž barevnost nevykazuje bathochromicitu a je stálá při vaření.

15 Při pěstování kultury popisovaného kmene, náležejícího k druhu *Penicillium oxalicum*, v živném prostředí - jak v tekutém, tak i v tuhém - byla pozorována již druhý den inkubace zesílená syntéza červeného barviva, které se vylučuje do prostředí. Výtěžnost vyčištěného červeného barviva činí 1,5 až 2 g z 1 litru živného prostředí.

20

Podstata vynálezu

Předmětem vynálezu je kmen *Penicillium oxalicum* var. *Armeniaca* CCM 8242, produkující červené barvivo.

25

Kmen byl uložen dne 19.3.1998 v mezinárodním ukládacím místě CCM Česká sbírka mikroorganismů Masarykovy univerzity, Tvrdého 14, 602 00 Brno, pod přírůstkovým číslem CCM 8242.

30

Tento kmen tvoří krátké konidiofory o rozměrech 60 až 70 krát 5 až 6 μm . V každé latě (broom-stick) je od 2 do 7 konidií. Konidie jsou kulaté o průměru 15 až 20 μm , s hladkým povrchem žlutozlaté barvy a lehce se rozpadají při mikroskopování.

35

V Czapkově minerálním prostředí tvoří kmen normálně rostoucí kolonie, které dosahují třetí den inkubace 2 až 2,5 cm a pátý až šestý den až 4,5 cm. Kolonie jsou nezvrásněné, sametové, hyfy jsou krátké, sporulující, s křehkým povrchem a vydrolující se. Při protřepávání nádoby se zralou kulturou je pro konidie charakteristické, že opadávají v mase. Zonálnost se neprojevuje. Podhoubí (mycelium) je krátké, má světle zelenou barvu, která se mění s růstem kultury na tmavě zelenou. Bílý proužek rostoucího okraje kolonie dosahuje šířky 1 až 2 mm. Obrácená strana kolonie získává červenou barvu, která s růstem kultury zesílí a difunduje do agarů, který se intenzivně zbarvuje do výrazně červené barvy.

40

45 Ve sladidlovém agaru jako organickém prostředí jsou kolonie velké, s krátkým vzdušným podhoubím, obarveným na zeleno. Při růstu kmene se neprojevuje biosyntéza červené barvy nebo se produkuje slabě.

50

V organickém prostředí, které tvoří zelný odvar-agar nebo bramborový odvar-agar, se tvoří rychle rostoucí kolonie o průměru 5 až 7 cm. Podhoubí je křehké, zelené. Vyskytuje se zesílená tvorba konidií žlutozlaté barvy. S růstem kultury obrácená strana kolonie získává červené zbarvení a barvivo difunduje do agarů, který se intenzivně zbarvuje do tmavě červené barvy.

Pigmentace na obrácené straně kolonie začíná již druhý den inkubace kmene a dosahuje maxima u sedmidenní kultury. Při hodnotě pH prostředí nižší než 3 a vyšší než 9 při normálním růstu

kultury se zastavuje biosyntéza červeného barviva nebo se produkuje slabě. Optimální hodnota pH pro produkování červeného barviva činí 5,6 až 6,2. Pach ani exudát se neprojevuje.

Kmen silně hydrolyzuje škrob, neředí želatinu, nepeptonizuje mléko.

Pohlucuje organický dusík ve formě aminokyselin asparaginu, valinu, serinu a tyrosinu.

Výborným zdrojem sacharidové výživy jsou L-(+)-maltóza, L-(+)-arabinóza, D-(+)-sorbit a D-(+)-mannit.

Z organických kyselin absorbuje jantarovou, mléčnou a maleinovou kyselinu.

Optimální teplota pro růst plísně a biosyntézu barviva je 27 až 29 °C. Produkční kmen se množí také při teplotě 37 až 38 °C, přičemž neztrácí vlastnost tvorby pigmentu. Produkční kmen plísně se uchovává metodou periodických přeočkování ve zkumavkách v houfech zelného agarizovaného prostředí v ledničce při teplotě +4 až +5 °C. Perioda přeočkování je 2 až 3 měsíce.

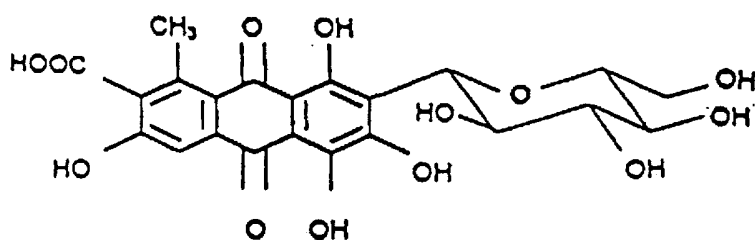
Předmětem vynálezu je dále způsob produkce červeného barviva, při němž se uvedený produkční kmen pěstuje při teplotě 25 až 30 °C, výhodně 27 až 29 °C, při pracovním tlaku 50 až 80 kPa, výhodně s kontinuálním promícháváním rychlostí 280 min⁻¹ při přívodu vzduchu v poměru 1,2 objemu vzduchu na 1,0 objemu živného prostředí, v živném prostředí o pH 3 až 9, výhodně pH 5,8 až 6,2, s obsahem uhlohydrátů výhodně 1,5 až 1,8 % hmotn., a amonného dusíku výhodně 0,66 až 0,69 % hmotn., po dobu 60 až 72 h, výhodně 64 až 68 h, načež se z živného prostředí oddělí kapalina a z ní se izoluje červené barvivo.

Dále je předmětem vynálezu použití získaného barviva jako potravinářského nebo kosmetického barviva.

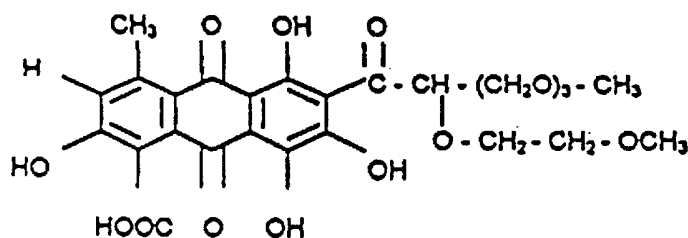
Barvivo je tmavě červený krystalický prášek ve vodném roztoku malinově červené barvy. Pach a chuť se neprojevuje ani v krystalické podobě, ani v roztoku.

Teplota tání je 127 °C (rozklad). Nerozpouští se ve vodě, je rozpustné v alkalickém roztoku (pH 9,0 až 9,5) a v ethylalkoholu. Dobře se rozpouští ve vaječném bílku, v tucích a v koncentrované kyselině octové. Barva barviva se nemění v závislosti na hodnotě pH, což znamená, že nevykazuje bathochromicitu. Vykazuje vysokou stálost na světle a odolnost proti teplotě. Neprojevuje se změna barevnosti při vaření v roztocích po dobu 5 h při teplotě 100 °C. Pohlucuje světlo ve viditelné oblasti ($X_{\max} = 435 \text{ nm}$ a 502 nm). Poměr vrcholů činí 1,0 až 1,5.

Z výsledků analýzy hmotovou spektroskopií v porovnání se vzorkem přírodního barviva E 120 je zřejmé, že získávané červené barvivo obsahuje kyselinu karmínovou a její deriváty, analogicky jako vzorek E 120. Kyselina karmínová má sumární vzorec C₂₂H₁₉O₁₃ a molekulovou hmotnost cca 493. Chemicky se jedná o kyselinu 7-β-D-glukopyranosyl-1-methyl-3,5,6,8-tetrahydroxy-antra-9,10-chinon-2-karboxylovou strukturního vzorce



a její volná forma je v barvivu doprovázena menším množstvím derivátů a/nebo komplexů, v nichž je kyselina karmínová vázána, například derivátu strukturního vzorce



který má sumární vzorec $\text{C}_{25}\text{H}_{26}\text{O}_{14}$ a molekulovou hmotnost cca 550. Ultrafialová, infračervená a hmotová spektroskopie potvrzuje antrachinonovou strukturu.

5

Množení kultury produkčního kmene se provádí ve zkumavkách s agarizovaným zelným odvarem jako živným prostředím metodou periodických přeočkování z pracovních houfů.

Toto živné prostředí je možno připravit například tímto postupem:

10

200 až 300 g jemně nastrohaného hlávkového zelí se přidá do 1 l pitné vody a vaří se po dobu 20 min. Po ochlazení na teplotu do $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ se roztok přefiltruje. Filtrát se doplní na 1 l a přidá se 20 g agar-agaru. Sterilizace živného prostředí probíhá při 70 až 80 kPa po dobu 20 min. Připravené prostředí se při teplotě 50 až $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ rozlije po 6 až 8 ml do sterilních zkumavek o rozměrech 18 x 150 mm a sterilizuje se v autoklávech v režimu: teplota $116\text{ }^{\circ}\text{C}$, tlak páry 100 kPa, doba sterilizace 20 min.

15

Po sterilizaci se zkumavky se šikmým agarizovaným prostředím předem vysuší v termostatu při teplotě $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 1 dne. Hotové houfy se očkují kulturou produkčního kmene a nechají se zrát při teplotě 27 až $29\text{ }^{\circ}\text{C}$. Doba inkubace je 5 dnů.

20

Odběr aktivních kolonií mikroorganismů se provádí metodou dalších přeočkování spor v Petriho misce s agarizovaným zelným odvarem. Jako základ pro výběr aktivních kolonií slouží intenzita obarvení kolonií o průměru minimálně 0,5 až 1 cm, s hladkým povrchem a rostoucí zónou minimálně 0,1 až 0,2 cm. Odběr aktivních kolonií se provádí v agarizovaném zelném odvaru.

25

Dle svých morfologických a kulturních vlastností se znovu získaný kmen plísně nejvíce přibližuje k druhu *Penicillium oxalicum* (dle I.M. Pidopličko, 1972).

30

Pro získání červeného barviva je možno provádět pěstování produkčního kmene ve fermentorech v tekutém živném prostředí hlubinnou metodou. Množství naočkovaného materiálu je 3 až 7 % obj. Pro očkování se využívají pracovní houfy s pětidenní kulturou, inkubovanou v zelném odvaru. Pěstování očkovaného materiálu se provádí při teplotě 27 až $29\text{ }^{\circ}\text{C}$ v průběhu 64 až 68 h.

35

Optimální podmínky pro vedení procesu mikrobiologické syntézy jsou teplota pěstování 27 až $29\text{ }^{\circ}\text{C}$, kontinuální promíchávání obvodovou rychlostí 280 min^{-1} , přívod vzduchu v poměru 1,2 objemu vzduchu na 1,0 objemu živného prostředí, přetlak v pracovním fermentoru 50 až 80 kPa.

40

Už po 30 až 35 h fermentace produkčního mikroorganismu se kapalina nad kulturou zbarvuje do červené barvy, jejíž intenzita dosahuje svého maxima - tmavě višňové barvy - po době inkubace 68 až 72 h.

45

Jako komponenty živného prostředí se používají uhlohydráty, různé cukry, vícemocné alkoholy a uhlovodíky a také odpady při výrobě cukru - melasa v množství 10 až 20 g na 1 l vody.

Pro zásobování dusíkem se využívá kukuřičný extrakt, kvasnicový autolyzát nebo extrakt a také sloučeniny, obsahující dusík v různých podobách (například aminokyseliny) v množství dusíku 0,5 až 0,7 % hmotn.

- 5 Optimálně má živné prostředí tyto hodnoty: pH 5,8 až 6,2, obsah uhlohydrátů 1,5 až 1,8 % hmotn., obsah amonného dusíku 0,66 až 0,69 % hmotn.

Příklady provedení vynálezu

10

Složení živného prostředí

Příklad 1

15

Krystalový cukr	12 až 20 g/l
Kukuřičný extrakt	5 až 10 g/l
Síran zinečnatý	0,002 g/l
Síran hořečnatý	0,001 g l.

20

Příklad 2

Krystalový cukr	12 až 20 g/l
Kvasnicový extrakt	5 až 10 g/l
Síran zinečnatý	0,002 g/l
Síran hořečnatý	0,001 g/l

25

Příklad 3

Melasa	12 až 20 g/l
Kukuřičný nebo kvasnicový extrakt nebo autolyzát	5 až 10 g/l
Síran zinečnatý	0,002 g/l
Síran hořečnatý	0,001 g/l.

35

Očkovacím materiálem pro očkování živného prostředí v pracovním fermentoru je dvoudenní kultura *Penicillium oxalicum* var. *Armeniaca* CCM 8242, která byla vypěstována v očkovacím přístroji. Množství očkovacího materiálu činí 3 až 7 % objemu živného prostředí.

40

Oddělení kapaliny z živného prostředí od biomasy plísně

Po ukončení biosyntézy červeného barviva se kapalina z živného prostředí odfiltruje nebo odstředí z důvodu oddělení od biomasy. Aby se barvivo vysráželo, okyselí se kapalina na pH 3,0 až 2,5. Okyselení je možno provést jakoukoli organickou nebo anorganickou kyselinou. Vysrážení je možno provádět síranem hlinitodraselným $AlK_2(SO_4)_3$. Tak se získá barvivo, které není rozpustné v zásadách a alkoholech. Rozpouští se v alkalickém roztoku při pH 9,0 až 10,0. Po vysrážení se barvivo od kapaliny oddělí odstředěním.

50

Příklad 4

Sraženina se rozpustí v ethylalkoholu a filtruje se, odstraní se alkohol a získá se barvivo v krystalické podobě.

Příklad 5

Sraženina se rozpustí v roztoku amoniaku při pH 9,0 až 10,0. Získá se 5 až 50 % vodný roztok červeného barviva.

5

Průmyslová využitelnost

Konečným produktem technologie je červené barvivo mikrobiologického původu, které je určeno pro potravinářský a kosmetický průmysl.

10

P A T E N T O V É N Á R O K Y

15

1. Kmen *Penicillium oxalicum* var. *Armeniaca* CCM 8242, produkující červené barvivo.

20

2. Způsob produkce červeného barviva, **vyznačující se tím**, že se produkční kmen *Penicillium oxalicum* var. *Armeniaca* CCM 8242 podle nároku 1 pěstuje při teplotě 25 až 30 °C při pracovním přetlaku 50 až 80 kPa v živném prostředí o pH 3 až 9 s obsahem uhlohydrátů a amonného dusíku po dobu 60 až 72 h, načež se z živného prostředí oddělí kapalina a z ní se izoluje červené barvivo.

25

3. Způsob podle nároku 2, **vyznačující se tím**, že se pěstování provádí při teplotě 27 až 29 °C při pracovním přetlaku 50 až 80 kPa s kontinuálním promícháváním obvodovou rychlostí 280 min⁻¹ při přívodu vzduchu v poměru 1,2 objemu vzduchu na 1,0 objemu živného prostředí o pH 5,8 až 6,2 s obsahem uhlohydrátů 1,5 až 1,8 % hmotn. a amonného dusíku 0,66 až 0,69 % hmotn. po dobu 64 až 68 h.

30

4. Použití červeného barviva, produkovaného způsobem podle nároku 2 nebo 3, jako potravinářského barviva.

35

5. Použití červeného barviva, produkovaného způsobem podle nároku 2 nebo 3, jako kosmetického barviva.

40

Konec dokumentu
