

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12P 15/00

[12] 发明专利申请公开说明书

C12N 1/14 C07C 66/02

C07C 63/44 C07C 50/18

[21] 申请号 98813936.7

A23L 1/275 A61K 7/00

//(C12P15/00 C12R1: 80)

[43] 公开日 2001 年 4 月 11 日

[11] 公开号 CN 1291237A

[22] 申请日 1998.5.20 [21] 申请号 98813936.7

[30] 优先权

[32] 1998.3.30 [33] CZ [31] PV970-98

[86] 国际申请 PCT/CZ98/00024 1998.5.20

[87] 国际公布 WO99/50434 英 1999.10.7

[85] 进入国家阶段日期 2000.9.27

[71] 申请人 爱德华·萨尔达里扬

地址 捷克共和国帕尔杜比采

[72] 发明人 爱德华·萨尔达里扬

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

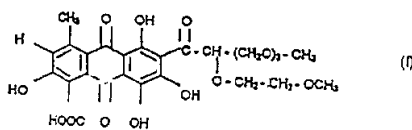
代理人 林晓红

权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图页数 0 页

[54] 发明名称 草酸青霉亚美尼亚变种的菌株及其应用

[57] 摘要

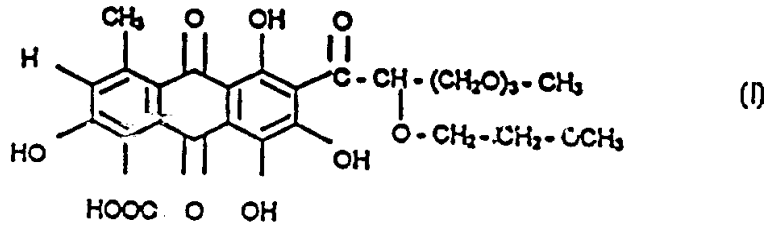
草酸青霉亚美尼亚变种菌株 CCM8242 产生结构式 (I) 的葱醌基羧酸衍生物, 其可用作着色剂, 特别是食品着色剂或化妆品着色剂。



ISSN 1008-4274

权 利 要 求 书

1. 草酸青霉亚美尼亚变种的菌株 CCM8242, 其产生结构式 I 的蒽醌基羧酸衍生物:



2. 生产权利要求 1 所定义的式 I 的化合物的方法, 其特征在于在 25-30°C 的温度, 0.5—0.8 大气压的标准压力下, 在含有碳水化合物和氨态氮的 pH3-9 的液体培养基中培养权利要求 1 的生产菌株 60-72 小时。

3. 根据权利要求 2 所述的方法, 其特征在于在 27-29°C 的温度, 0.5—0.8 大气压标准压力下, 以 280rpm 的圆周速度持续混合, 以 1.2 空气体积比 1.0 培养基体积的比例供应空气, 培养基的 pH 为 5.8—6.2, 并含有 1.5—1.8 重量%的碳水化合物和 0.66—0.69 重量%的氨态氮, 培养 64—68 小时。

4. 由权利要求 2 或 3 的方法获得的权利要求 1 中定义的式 I 的蒽醌基羧酸衍生物。

5. 权利要求 4 定义的蒽醌基羧酸衍生物作为着色剂的应用。

6. 权利要求 4 定义的蒽醌基羧酸衍生物作为食品着色剂的应用。

7. 权利要求 4 定义的蒽醌基羧酸衍生物作为化妆品着色剂的应用。

说明书

草酸青霉亚美尼亚变种的菌株及其应用

技术领域

本发明涉及具有生产新的红色色素的特性的真菌的新菌株，所述的红色色素可用作食品 and 化妆品工业的着色剂。

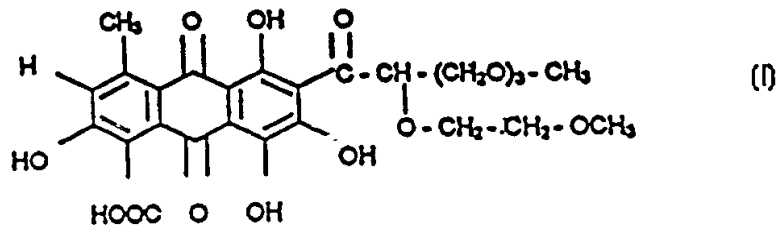
背景技术

在食品工业和化妆品工业中，在相应的产品的组成成分中需要溶解性良好的着色剂，其颜色不显示向红效应并且其在煮沸时是稳定的。

当将所述的属于草酸青霉的菌株培养于液体或固态形式的培养基时，在培养的第二天即已观察到红色色素的合成增加，该红色色素释放到培养基中。纯化的红色色素的产量是 1 升营养培养基中 1.5-2 克。

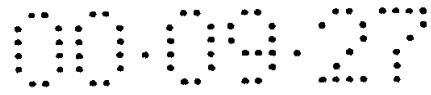
本发明的内容

本发明涉及草酸青霉亚美尼亚变种 (*Penicillium oxalicum* var. *Armeniaca*) 菌株 CCM8242，其产生结构式 I 的蒽醌基羧酸衍生物



该菌株保藏于国际保藏机构 CCM，即 Masaryk 大学的捷克微生物保藏中心，Tvrdeho 14, 60200 Brno, 捷克共和国，保藏日 1998 年 3 月 19 日，保藏号为 CCM 8242。

所说的菌株形成 60-70×5-6 微米的短分生孢子梗，各个帚状棒包括 2-7 个分生孢子，该分生孢子呈直径为 15-20 微米的圆形，具有光滑的金黄色表面，在用显微镜检查中易于区分。



光滑的金黄色表面，在用显微镜检查中易于区分。

在 Czapek' s 无机培养基中，菌株形成标准生长的菌落，该菌落在培养的第三天达到 2-2.5 厘米，在第五到第六天达到 4.5 厘米，该菌落是不确定(unbooked)的、天鹅绒状，菌丝短，能形成孢子，具有易碎表面并且碎裂。当振荡具有成熟的培养物的容器时，分生孢子的特征是它们大块掉落。没有显示圈的效果。菌丝体短，呈浅绿色，在培养过程中转变为深绿色。生长的菌落的边缘有 1-2 毫米宽的白色。菌落的反面呈红色，在培养物的生长过程中所说的红色变深，并且扩散到琼脂中，使之呈广泛着色的明显的红色。

在作为有机培养基的麦芽琼脂中，菌落大，具有短的浅绿色的菌丝体。在菌株生长期间，没有显示红色的生物合成，或仅仅稍微产生。

在以甘蓝汁琼脂或土豆汁琼脂为代表的有机培养基中，形成快速生长的菌落，具有 5-7 厘米的直径。菌丝体易碎，呈绿色。其显示产生更高产量的金黄色分生孢子。在培养物的生长期间，菌落的反面产生红颜色并且红色色素扩散到琼脂中，变成深红色。

菌落反面的色素沉积开始于菌株培养的第二天，并且在培养的第 7 天达到最大值。在培养基的 pH 值低于 3 和高于 9 时，在培养物进行标准生长时，红色色素的生物合成停止或产生得很少。产生红色色素的最适 pH 值是 5.6 到 6.2。没有产生气味或渗出物。

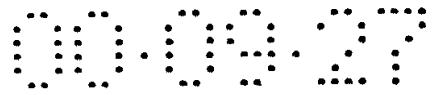
菌株强烈地水解淀粉，它不稀释明胶并且不使牛奶酪化。

其吸收天冬氨酸，缬氨酸，丝氨酸和酪氨酸形式的有机氮。

L- (+) -麦芽糖，L- (+) -阿拉伯糖，D- (+) -山梨醇和 D- (+) -麦芽糖是多糖营养的极好的来源。

对于有机酸，它吸收琥珀酸，乳酸和马来酸。

真菌生长和色素的生物合成的最适温度是 27-29℃。生产菌株可在 37-38℃ 的温度下繁殖，并且不会失去形成色素的特性。在温度为



+4℃到+5℃的冰柜中在含有甘蓝汁琼脂化的培养基的试管中借助于定期的重接种方法，可以保持真菌生产菌株。重接种的期间为 2-3 个月。

本发明的另一方面提供了生产式 I 的葱醌基羧酸衍生物的方法，其中将上述生产菌株在 25-30℃的温度生长，优选的是在 27-29℃生长，优选的标准压力为 0.5-0.8 大气压，有利的是以 280rpm 持续混合，以 1.2 空气体积比 1.0 液体培养基体积的比例供应空气，培养基的 pH 值为 3-9，优选的是 5.8 到 6.2，该培养基含有碳水化合物，优选的是 1.5 到 1.8 重量%，并含有氨态氮，优选为 0.66-0.69 重量%，培养 60-72 小时，优选的是 64-68 小时。

本发明的另一方面是根据本发明方法获得的式 I 的葱醌基羧酸衍生物，以及其作为着色剂、特别是食品着色剂或化妆品着色剂的应用。

获得的混化合物的实验式为 $C_{25}H_{26}O_{14}$ ，分子量为 520.2。根据分析（紫外光谱，衍射光谱和质谱），其属于葱醌。

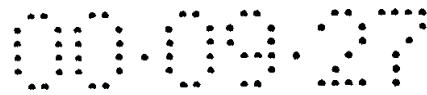
该色素是暗红色结晶粉末，在水溶液中呈木莓红色。在结晶形式或溶液中无臭无味。

其熔点是 127℃（分解）。其不溶于水，溶于碱性溶液（pH 为 9.0 到 9.5）和乙醇。在蛋白，脂肪和浓乙酸中溶解性良好。色素的颜色不基于 pH 值发生变化，意味着没有向红效应。它对光具有高度稳定性，对温度具有抗性。在溶液中在 100℃煮沸 5 小时没有发生颜色的变化。它在可见光范围内（ $\lambda_{max}=435nm$ 和 $502nm$ ）吸收光。峰值的比例为 1.0—1.5。

借助于定期从使用的菌种重接种可在具有琼脂化的甘蓝汁液体培养基的试管中进行生产菌株培养物的繁殖。

例如可以通过下面的方法制备上述的培养基：

将 200 到 300 克的精细磨碎的甘蓝加入到 1 升的饮用水中，并且



煮沸 20 分钟。在冷却到 50℃ 温度之后，过滤溶液。将滤液补充到 1 升，加入 20 克琼脂。在 70-80kPa (0.7-0.8 大气压) 对该培养基灭菌 20 分钟。将温度为 50-55℃ 的制备的培养基分装到无菌的直径为 18 × 150 毫米的试管中，每个试管为 6-8 毫升，在下面条件下高压蒸气灭菌：116℃，蒸气压力为 1.0 大气压，灭菌时间为 20 分钟。

在灭菌之后，将具有琼脂培养基斜面的试管预先在 37℃ 的温箱中干燥 1 天。以生产菌株的培养物接种上面的试管，将它们置于 27-29℃ 到成熟。培养时间是 5 天。

通过在具有甘蓝汁琼脂的培养皿中重接种孢子收获该微生物的活性菌落。选择活性菌落的根据是菌落的着色强度的最小直径为 0.5 到 1 厘米，表面光滑并且生长圈最小为 0.1 到 0.2 厘米。将活性菌落收集到甘蓝汁琼脂中。

基于其形态和培养特性，回收的真菌菌株最接近于草酸青霉（根据 I.M. Pidoplichko, 1972）。

为获得式 I 的化合物，可以借助于浸没方法，在含有液体培养基的发酵罐中培养生产菌株。接种材料的量是 3-7 重量%。在接种之后，使用具有在甘蓝汁中培养 5 天的培养物。种子材料的培养是在 27-29℃ 的温度培养 64 到 68 小时。

进行微生物学合成程序的最适条件包括温度为 27-29℃，以圆周速度为 280/分钟持续混合，以 1.2 空气体积比 1.0 培养基体积的比例供应空气，运行的发酵罐中的标准压力为 0.5 到 0.8 大气压。

在已经发酵了生产微生物 30 到 35 小时之后，培养物上层液体变成红色，在培养 68-72 小时之后，红色的强度呈其最大值—深鲜红色。

作为培养基的成分，可以使用碳水化合物，各种多糖，多官能醇和烃，以及蔗糖生产的废料—糖蜜，其量为每升水为 10-20 克。

对于氮源，可以使用玉米提取物，酵母自溶物或提取物，也可以

使用各种形式（如氨基酸）的含氮化合物，氮的用量为 0.5 到 0.7 重量%。

培养基的最适值如下：pH5.8—6.2，碳水化合物的含量为 1.5—1.8 重量%，氨态氮的含量为 0.66—0.69 重量%。

实施例

培养基的组成

实施例 1

粒状糖	12-20 克/升
玉米提取物	5-10 克/升
硫酸锌	0.002 克/升
硫酸镁	0.001 克/升

实施例 2

粒状糖	12-20 克/升
酵母提取物	5-10 克/升
硫酸锌	0.002 克/升
硫酸镁	0.001 克/升

实施例 3

糖蜜	12-20 克/升
玉米提取物或酵母 提取物或自溶物	5-10 克/升
硫酸锌	0.002 克/升
硫酸镁	0.001 克/升

将已在接种装置中培养了 2 天的草酸青霉亚美尼亚变种 CCM8242 接种到发酵罐的培养基中，接种材料的量为培养基的 3—7% 体积。

从真菌生物量分离培养物上清液

在红色色素的生物合成完成之后，从培养基过滤液体或离心以从

生物量分离出液体。为了沉淀色素，将液体酸化到 pH 3.0—2.5。可采用任何有机或无机酸进行酸化。可以以硫酸铝钾 $\text{AlK}_2(\text{SO}_4)_3$ 进行沉淀。因此获得了不溶于碱和醇的色素。它在 pH 为 9.0—10.0 的碱性溶液中是可溶的。在沉淀之后，通过离心从液体分离色素。

实施例 4

将沉淀溶解于乙醇并过滤。除去醇，获得结晶形式的色素。

实施例 5

将沉淀溶解于 pH 为 9.0—10.0 的氨溶液中。获得了 5-50% 的红色色素的水溶液。

工业实用性

本发明的技术的终产物是来源于微生物的红色色素，可应用于食品和化妆品工业。