

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

(21)

N° 82 08564

(54) Production de pigment de monascus.

(51) Classification internationale (Int. Cl. ³). C 09 B 61/00.

(22) Date de dépôt..... 17 mai 1982.

(33) (32) (31) Priorité revendiquée : Japon, 16 mai 1981, n° 73832/81.

(41) Date de la mise à la disposition du
public de la demande..... B.O.P.I. — « Listes » n° 46 du 19-11-1982.

(71) Déposant : Société dite : KABUSHIKI KAISHA HAYASHIBARA SEIBUTSU KAGAKU KEN-
KYUJO, résidant au Japon.

(72) Invention de : Toshio Miyake, Shoichi Ohno et Shuzo Sakai.

(73) Titulaire : *Idem* (71)

(74) Mandataire : Armand Kohn,
5, av. Foch, 92380 Garches.

La présente invention concerne un procédé amélioré pour la production de pigment de *Monascus*.

Le pigment de *Monascus* est un pigment naturel, rouge, comestible, produit par un microorganisme du genre *Monascus*, largement utilisé depuis les temps anciens en Chine et dans les pays du sud-est asiatique dans différents aliments comme An-chiu et Tou-Fu-Ju.

Récemment, on a interdit l'utilisation, comme agents colorants comestibles, de différents agents colorants synthétiques, présentant un danger d'activité carcinogène et/ou tératogène. De ce fait, la demande en agents colorants comestibles, naturels, sans danger, a inévitablement crû, et le pigment de *Monascus* est l'un d'eux. Des études antérieures sur la production de ce pigment sont reportées par exemple dans J. Ferment. Technol., Vol. 51, N°6, pp. 407-414 (1973), et dans Agr. Biol. Chem., Vol. 39, N°9, pp. 1789-1795 (1975).

Quelques procédés pour la production de pigment de *Monascus* sont également décrits dans des demandes de brevet : par exemple, le Kokai japonais N° 4/80, décrit qu'il est préférable d'utiliser un microorganisme du genre *Monascus* ayant une aptitude à produire de l'amylase aussi faible que possible ; et le brevet japonais, publié sous le n° 44 880 /73, indique que les constituants préférés pour le milieu de culture sont des saccharides, par exemple glucose et dextrine et des protéines hydro-solubles.

Cependant, tous les essais, décrits dans ces demandes de brevet, aboutissent à des rendements en pigment non satisfaisants.

La demanderesse, afin d'établir un procédé de production de pigment de *Monascus* à l'échelle industrielle, a effectué des recherches sur différents constituants à action optimale du milieu de culture, principalement sur les sucres alcools.

La présente invention est basée sur la constata-

tion que l'on peut obtenir, de façon inattendue, de grandes quantités de pigment de *Monascus*, par culture d'un micro-organisme du genre *Monascus*, capable de produire ce pigment, dans un milieu nutritif contenant du maltitol.

5 Le nouveau procédé selon l'invention de production de pigment de *Monascus*, est caractérisé par la culture dans un milieu nutritif contenant du maltitol, d'un micro-organisme du genre *Monascus* capable de produire ce pigment, suivie de la récolte du pigment résultant, à partir de cette culture.

On peut utiliser conformément à l'invention, comme micro-organisme du genre *Monascus*, tout micro-organisme de ce genre dans la mesure où il produit ce pigment au cours de sa culture ; conviennent notamment *Monascus anka* ATCC 15 16360, *Monascus anka* IFO 6540, et *Monascus purpureus* IFO 4513.

Les milieux de culture utilisables sont ceux qui contiennent du maltitol et sur lesquels le micro-organisme peut pousser et libérer le pigment. La teneur en maltitol du milieu de culture, qui dépend du procédé de culture utilisé, est comprise dans l'intervalle d'environ 0,1 à 95%, rapporté au produit sec, de préférence entre 1 et 90%. Habituellement on peut ajouter au milieu de culture d'autres substances, par exemple des minéraux comme phosphates, sulfates, sels de sodium, potassium, magnésium, calcium ou 25 fer, ainsi qu'éventuellement de l'amidon ou des substances amylacées comme graines ou tubercules, dont l'amidon est le constituant principal, comme source de carbone ; des composés azotés organiques ou minéraux comme nitrates, sels d'ammonium, protéines, peptides ou amino-acides, comme source 30 d'azote, et, pour amorcer, une petite quantité de solution éthanolique de pigment de *Monascus*.

On a également constaté que la combinaison du maltitol avec du L-aspartate de magnésium et/ou une substance amylacée, donne un effet synergique remarquable sur la production 35 de pigment de *Monascus*.

Les procédés de culture, utilisables conformément à l'invention, comprennent la culture submergée et la culture solide, au cours desquelles un micro-organisme du genre *Monascus*, capable de produire le pigment, est habituellement cultivé à une température comprise dans l'intervalle de 25° à 40°C pendant environ 2 à 15 jours.

En ce qui concerne le procédé de récolte du pigment à partir de la culture, on peut employer, conformément à l'invention, tout procédé, sans considération particulière, pourvu qu'il permette de récolter, à partir de la culture, un pigment utilisable dans les aliments : par exemple, dans le cas de culture solide, celle-ci peut être séchée et pulvérisée sans traitement ultérieur, afin de donner un produit pulvérulent, ou bien ce produit pulvérulent peut être soumis en plus à un stade d'extraction par solvant organique, comme éthanol, pour donner un produit liquide. L'évaporation et l'élimination du solvant à partir de ce liquide, donnent un pigment de *Monascus* de grande pureté, sous forme de pâte ou de poudre.

Dans le cas de culture submergée, on peut utiliser celle-ci telle quelle comme agent de coloration comestible, liquide, pour le traitement des aliments, ou bien, habituellement, sous forme floculée par addition d'un agent de floculation comme l'alun, le produit résultant étant séparé en une portion liquide et une portion insoluble contenant les mycelia, au moyen de centrifugation et/ou filtration. Comme une grande partie du pigment se trouve dans les mycelia, la portion insoluble peut être soumise, comme dans le cas de la culture solide, à une extraction ultérieure à l'aide de solvant organique.

Le pigment de *Monascus* ainsi obtenu est avantageusement utilisable comme agent colorant rouge, naturel, comestible, pour différents aliments, par exemple confiseries, bonbons, desserts, glaces, produits lactés, produits dérivés de la viande et de la chair de poisson, boissons sucrées, yoghourts, pâtes, produits laitiers, aliments en boîte, en

bouteille et conserve au vinaigre.

Les expérimentations suivantes expliquent concrètement la présente invention.

EXPERIMENTATION 1

5 Choix de la source de carbone

On effectue ce choix principalement sur des sucres alcools.

La culture à ensemer est réalisée comme suit : des flacons secoueurs de 500 ml, contenant des prélèvements de 50 ml d'un milieu (pH 6,2) constitué par 5% en poids/volume

- 10 de poudre de riz, 0,25% en poids/volume de KH_2PO_4 , 0,15% en poids/volume de NaNO_3 , 0,1% en poids/volume de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,1% en poids/volume d'acide casamino, 0,001% en poids/volume de $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ et de l'eau du robinet, sont mis à l'autoclave à 120°C pendant 20 minutes en vue de leur
- 15 stérilisation, puis sont refroidis etensemencés avec *Monascus anka* ATCC 16360 de manière habituelle. Les mélanges obtenus sont alors cultivés à 30°C pendant 4 jours, sous agitation.

- Ensuite, on réalise comme suit la culture principale (sauf
- 20 indication contraire, les pourcentages sont donnés en poids/volume) : des flacons secoueurs de 500 ml, contenant des prélèvements de 50 ml d'un milieu constitué par 3% de l'une des substances énumérées dans le tableau 1 (tous les pourcentages sont exprimés sur la base de produit solide sec)
- 25 en tant que source de carbone, 0,25% de KH_2PO_4 , 0,2% de NaNO_3 , 0,1% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,1% d'acide casamino, 0,001% de $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ et de l'eau du robinet, sont mis à l'autoclave à 120°C en vue de leur stérilisation, puis sont refroidis etensemencés avec la culture à raison de 2% en
- 30 volume/volume, comme plus haut. On laisse ensuite se développer la culture à 30°C pendant 7 jours sous agitation. Les résultats de l'expérimentation sont indiqués dans le tableau 1, la production de pigment de *Monascus A₅₀₀* y étant déterminée comme suit : après avoir ajusté le milieu
- 35 de culture à pH 6,5 par addition d'acide chlorhydrique

3 N et/ou d'hydroxyde de sodium, on le place dans un flacon d'Erlenmeyer de 500 ml, et on y ajoute 200 ml d'éthanol anhydre, de façon à obtenir une solution éthanolique à 80% en volume/volume. Puis, le flacon contenant cette solution est placé sur un secoueur rotatif, à 30°C pendant 1 heure, afin d'extraire le pigment, et l'extract obtenu est filtré sur papier filtre du commerce, "Toyo Roshi N°2" de Toyo Roshi Company Ltd, Tokyo. Le filtrat obtenu est ensuite éventuellement dilué avec une solution aqueuse d'éthanol à 80% en volume/volume. Après dilution, on détermine la capacité d'absorption du filtrat pour une longueur d'onde de 500 nm, en utilisant une cellule de 1 cm, et la production de pigment est calculée à l'aide de l'équation suivante :

Production de pigment (A_{500}) = Absorption $\times \frac{250}{50}$ $\times$ dilution
Il ressort des résultats expérimentaux du tableau 1, que le maltitol, parmi les produits essayés, est la source de carbone la plus souhaitable pour la production de ce pigment.

TABLEAU 1

20	N°	Source de carbone (3% en poids/volume)	Production de Pigment (A_{500})
	1	Ethanol	7,1
	2	Glucose	0,8
	3	Maltose	3,2
25	4	Amidon soluble	1,7
	5	Poudre de riz	3,7
	6	Xylitol	4,1
	7	Mannitol	0,4
	8	Sorbitol	2,8
30	9	Dulcitol	4,2
	10	Maltitol	31,4
	11	Sirop de maltose hydrogéné*	29,5
	12	Isomaltitol	3,9
	13	Lactitol	3,1
35	14	Cellobiitol	2,9

TABLEAU 1 (suite)

N°	Source de carbone (3% en poids/volume)	Production de Pigment (A ₅₀₀)
15	Maltotriitol	4,4
5 16	Maltotétraitol	3,8
17	Amylitol	2,9

Note*: Le sirop de maltose hydrogéné est un produit du commerce, à teneur en maltitol de l'ordre de 78% sur la base du produit solide sec, fabriqué par Hayashibara Company Ltd sous le nom de "Mabit".

EXPERIMENTATION 2

Choix de la source d'azote

On essaye des substances, principalement des amino-acides, dans le but de déterminer la source d'azote à action optimale dans un milieu nutritif contenant du maltitol comme source de carbone.

On réalise la culture comme dans l'expérimentation 1, pour produire le pigment de *Monascus*, à ceci près que la teneur en maltitol dans le milieu de culture est de 3%, et la teneur en acide casamino est de 0,5% comme dans le tableau 2. Les résultats expérimentaux sont donnés dans le tableau 2.

TABLEAU 2

N°	Source d'azote (0,5% en poids/volume)	Production de pigment (A ₅₀₀)
25 1	néant	28,8
2	Acide Casamino	36,6
3	Extrait de levure	30,3
4	Polypeptone	38,3
5	Glycine	32,5
30 6	L-Alanine	43,1
7	Acide L-Glutamique	44,7
8	L-Glutamate de sodium	47,2
9	L-Glutamate de magnésium	45,0
10	L-Asparagine	58,6
35 11	Acide L-Aspartique	62,5

TABLEAU 2 (suite)

N°	Source d'azote (0,5% en poids/volume)	Production de pigment
		(A ₅₀₀)
12	L-asparatate de sodium	62,1
5 13	L-asparatate de potassium	66,2
14	L-asparatate de magnésium	116,4

Il ressort des données du tableau 2 que l'on obtient la production la plus forte de pigment de *Monascus*, avec comme source d'azote combinée au maltitol, L-asparagine, acide L-aspartique ou un L-aspartate, en particulier L-aspartate de magnésium.

EXPERIMENTATION 3

Combinaison du maltitol avec L-aspartate de magnésium et poudre de riz

On étudie l'effet synergique sur la production de pigment, par utilisation de maltitol et de L-aspartate de magnésium, tous deux confirmés comme d'excellents constituants de milieu de culture par les expérimentations précédentes, en combinaison avec de la poudre de vieux riz : à un milieu de base, constitué par 0,25% de KH_2PO_4 , 0,2% de NaNO_3 , 0,1% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,001% de $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ et de l'eau du robinet, on ajoute 3% de maltitol, 0,5% de L-aspartate de magnésium et/ou 3% de poudre de riz, pour préparer le milieu de culture nutritif du tableau 3. Ensuite, on effectue la culture principale comme dans l'expérimentation 1, pour produire le pigment. Cette production est estimée identique à celle de ladite expérimentation, et les résultats sont rassemblés dans le tableau 3.

(voir tableau 3 à la page suivante).

TABLEAU 3

N°	Composition du milieu	Production de pigment (A ₅₀₀)
1	Milieu de base	0,1
5 2	Milieu de base plus maltitol	28,8
3	Milieu de base plus aspartate de magnésium	15,1
4	Milieu de base plus poudre de riz	2,6
5 10	Milieu de base + maltitol + aspartate de magnésium	116,4
6	Milieu de base + maltitol + poudre de riz	107,3
7	Milieu de base + aspartate de Mg + poudre de riz	41,4
8 15	Milieu de base + maltitol + aspartate de Mg + poudre de riz	243,0

Il ressort des données du tableau 3 que la combinaison du maltitol avec le L-aspartate de magnésium et la poudre de riz exerce un effet synergique remarquable sur la production de pigment de *Monascus*.

Plusieurs formes de réalisation non limitatives de l'invention sont décrites ci-après à titre d'illustration (Sauf indication contraire, les pourcentages sont donnés en poids/volume).

EXEMPLE 1

On place 16 litres d'un milieu constitué par 5% de maltitol, 0,7% de L-aspartate de magnésium, 0,25% de KH_2PO_4 , 0,2% de NaNO_3 , 0,1% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,001% de $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ et de l'eau du robinet, dans une fiole à fermentation de 30 litres, et l'on met à l'autoclave à 120°C pendant 30 minutes, afin de stériliser. Après refroidissement on ensemence ce milieu avec une culture de *Monascus anka* ATCC 16360, à raison de 2% en volume/volume, et on laisse se développer la culture à 33°C pendant 4 jours de manière habituelle, sous

aération et agitation ; on obtient une culture colorée en orange foncé.

La production en pigment de *Monascus* dans la culture est déterminée comme dans l'expérimentation 1, sur 50 ml de cette

5 culture. Cette production est de l'ordre de 172,3.

Le pigment de *Monascus* ainsi obtenu est avantageusement utilisable comme agent colorant rouge pour différents aliments à teneur élevée en protéines, par exemple des produits de chair de poisson, de viande et de viande artifi-

10 cielle.

EXEMPLE 2

16 litres d'un milieu constitué par 4% de sirop de maltose hydrogéné ("Mabit"), 0,5% de L-aspartate de magnésium, 3% de poudre de riz, 0,25% de KH_2PO_4 , 0,15% de NaNO_3 , 0,1%
15 de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, et de l'eau du robinet, sont placés dans une fiole à fermentation de 30 litres, que l'on met à l'autoclave à 120°C pendant 30 minutes pour stériliser. Après refroidissement, on ajoute à ce milieu, dans des conditions stériles, 300 ml de solution éthanolique de pigment de *Mo-*
20 *nascus*, contenant une quantité de pigment telle, que la capacité d'absorption dans les conditions définies précédemment est voisine de 2, puis on ensemence comme dans l'exemple 1 le mélange ainsi obtenu avec une culture d'ensemencement de *Monascus anka* ATCC 16360, et on laisse s'effectuer
25 la culture pendant 6 jours à 30°C, sous aération et agitation, ce qui a pour résultat une culture colorée en orange foncé.

La production de pigment dans cette culture est déterminée comme dans l'expérimentation 1. Elle est de l'ordre de 246,2.

30 On ajoute ensuite à cette culture de la solution d'alun à 4%, et l'on ajuste le pH de ce mélange à 6,5 avec de l'hydroxyde de sodium 4N, puis l'on centrifuge le produit résultant, ce qui donne un sédiment à teneur élevée en pigment de *Monascus*.

35 On extrait alors ce sédiment dans 2 volumes d'éthanol anhy-

dre à 60°C pendant 2 heures, et le résidu est extrait de manière identique à 2 reprises, ce qui donne une solution éthanolique de coloration rouge pourpre foncé, à forte teneur en pigment de *Monascus*. Le rendement est de l'ordre

5 de 90% rapporté à la culture de départ.

La solution éthanolique à forte teneur en pigment de *Monascus* est avantageusement utilisable comme colorant rouge pour différents aliments, par exemple boissons alcooliques, comme vins et liqueurs ; confiseries comme gelées, bava-

10 ses et bonbons ; boissons sucrées comme jus et boissons gazeuses ; desserts glacés comme sorbets et crèmes glacées ; ainsi que pour la coloration de conserves au vinaigre, par exemple "Fukuzin-zuke" une espèce de conserve au vinaigre de style japonais.

15 EXEMPLE 3

On lave avec de l'eau 1 kg de riz poli, et on le fait tremper pendant 2 heures dans 3 litres de sirop de maltose hydrogéné, ("Mabit") à une concentration de 1%, rapporté au produit solide sec. Après élimination de l'eau par essorage

20 pendant 1 heure, ce riz est placé dans un récipient, nommé "Koji-Buta", muni à son extrémité inférieure d'un tamis métallique, et le tout est mis à l'autoclave à 120°C pendant 30 minutes, afin d'être stérilisé. Après refroidissement dans les conditions ambiantes, onensemence le contenu avec

25 *Monascus anka* IFO 6540 par pulvérisation d'une culture d'ensemencement, et on laisse la culture se développer à 33°C pendant 10 jours, pour obtenir du koji rouge. Ce koji rouge est chauffé à l'air chaud et pulvérisé, ce qui donne environ 910 g de poudre.

30 Au cours de cet exemple, la production de pigment de *Monascus* est déterminée comme/suit : 2 g de la poudre sont placés dans un flacon d'Erlenmeyer de 500 ml, et on y ajoute 250 ml d'une solution aqueuse d'éthanol à 80% en volume/volume. La capacité d'absorption de la solution est ensuite déterminée

35 minée comme dans l'expérimentation 1, afin de connaître la

production de pigment. Celle-ci est de l'ordre de 145,2.
La poudre ainsi obtenue peut être également avantageuse-
ment utilisée comme colorant rouge comestible pour dif-
férents aliments, par exemple assaisonnements comme purée
5 de tomate et par exemple marque "Ketchup" ; confitures
comme confiture de framboise ou de fraise ; "Kasu-Zuke"
comme ceux de fruits de mer (conserves au vinaigre de style
japonais) ; "Koji-Zuke" comme ceux de langouste et de brème
de mer (conserves au vinaigre de style japonais). En outre,
10 cette poudre peut être utilisée pour produire An-chiu.

Revendications

1. Procédé pour la production de pigment de *Monascus* qui consiste à cultiver dans un milieu nutritif un micro-organisme de genre *Monascus* capable de produire ce pigment, puis à récolter le pigment résultant à partir de la culture,
5 caractérisé en ce que le milieu de culture renferme du maltitol comme source de carbone.
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la teneur du milieu en maltitol est compris entre 0,1 et 95%, de préférence entre 1 et 90%, du produit solide
10 sec.
3. Procédé selon une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que le micro-organisme est *Monascus anka* ATCC 16360, *Monascus anka* IFO 6540 ou *Monascus purpureus* IFO 4513.
4. Procédé selon une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que le milieu nutritif contient outre le maltitol, une substance amylacée et une ou plusieurs des substances suivantes : L-asparagine, acide L-aspartique, L-aspartate de magnésium, L-aspartate de sodium, L-aspartate de potassium.
15
5. Procédé selon une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que la substance amylacée est de la poudre de riz.
20
6. Procédé selon une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que le micro-organisme est cultivé en présence
25 d'une solution éthanolique de pigment de *Monascus*, utilisée pour induire la production du pigment dans le micro-organisme.