(19)

SUOMI - FINLAND
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 911948 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS**
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE PUBLIC

(21) Patenttihakemus - Patentansökan - Patent application 911948

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation - International patent classification
C12N 1/16
C12N 1/06
C12P 23/00
A23K 1/18
A23L 1/27

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **22.04.1991**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **22.04.1991**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **24.10.1991**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **13.06.2019**

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

23.04.1990 US 513420

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • Burns Philp Food Inc., 222 Sutter Street San Francisco, CA 94108, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Torregrossa, Robert Emile, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
2 • Prevatt, William Dudley, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Berggren Oy Ab, Antinkatu 3 C, 00100 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention
Menetelmä astaksantiinin tuottamiseksi Phaffia rhodozymassa
En process för att framställande av astaxantin i Phaffia rhodozyma

(83) Mikro-organismitalletus - Deposition av mikroorganism - Deposit of microorganism

Y-18549 NRRL	Y-18550 NRRL	Y-18551 NRRL	Y-18552 NRRL
Y-18553 NRRL	Y-18554 NRRL	Y-18555 NRRL	Y-18556 NRRL

24

Menetelmä astaksantiinin tuottamiseksi Phaffia rhodozymassa
En process för att framställande av astaxantin i Phaffia rhodozyma

Tämä keksintö koskee hyvin tuottavia Phaffia rhodozyma-kantoja, joista saadaan astaksantiinia suurina saantoina, menetelmiä Phaffia rhodozyman viljelemiseksi ja menetelmiä, joilla saadaan Phaffia rhodozymassa tuotettua astaksantiinia muodossa, josta saadaan ravintopigmenttilisä kalalle, äyriäisille ja linnuille.

Astaksantiini (3,3'-dihydroksi-β,β-karoteeni-4,4'-dioni) on oksikaroteenipigmentti, jota on runsaasti kasveissa ja eläimissä. Se on vallitseva oksikaroteenipigmentti äyriäisissä ja lohen sukuisissa. Astaksantiinia on myös levässä, hiivassa (kuten Phaffia rhodozyma) ja linnuissa.

Kaupallisessa vesiviljelmässä on toivottavaa lisätä astaksantiinia lohen sukuisten ja äyriäisten ruokaan, jotta saataisiin tunnusmerkillinen vaaleanpunainen väri, joka on synnynnäinen lohen sukuisille, äyriäisille ja linnuille. Tämän lohen sukuisille ja äyriäisille tunnusomaisen vaaleanpunaisen värin, jota tuotetaan kaupallisesti vesiviljelmässä, uskotaan olevan tärkeä kannustamaan kuluttajaa hyväksymään lohen sukuiset ja äyriäiset tuotettavaksi vesiviljelyllä. Tällä hetkellä ei ole olemassa taloudellista astaksantiinilähdettä.

Eräs mahdollinen astaksantiinilähde vesiviljelytarkoituksiin on hiiva Phaffia rhodozyma. Phaffia rhodozyma on tunnistettu siitä lähtien, kun se luokiteltiin hiivalajiksi, jolla on korkea astaksantiinisisältö (n. 85 % karoteenipigmentistä on astaksantiinia, N.W. Miller, et al. Int. J. Syst. Bacteriol., Vol. 26, s. 286 (1976). Tämän hiivan käyttöä ravintolisänä lohen sukuisten ja äyriäisravinnossa ovat tutkineet myös Eric A. Johnson ja muut tutkijat 1980-luvun alusta lähtien.

Phaffia rhodozyman kehittymistä kaupalliseksi astaksantiinilähteeksi on estänyt Phaffia rhodozyma-kantojen, joilla on sopivat kasvuominaisuudet ja tuottavat suuria saantoja astaksantiinia, puute. Sopiviin kasvuominaisuuksiin kaupallisille Phaffia rhodozyma-kannoille kuuluisi kasvunopeudet, jotka ovat verrattavissa villiin Phaffia rhodozyma-kantoihin, suuri kantastabiilisuus, vähentynyt taipumus vaahdota, muutama vitamiinin tai kasvulisäkkeiden erityisvaatimus. Lisäksi kaupallisten Phaffia rhodozyma-kantojen täytyy tuottaa myös jatkuvasti suuria astaksantiinimääriä. Tällä hetkellä saatavilla olevat Phaffia rhodozyma-kannat voivat tuottaa 30-2000 µg solumassaa. Valitettavasti tällä hetkellä saatavilla olevat runsaasti astaksantiinia tuottavilla kannoilla on äärettömän alhaiset kasvunopeudet (kuten kanta DBT 403, josta on raportoitu WIPO-hakemuksessa WO 88/08025) verrattuna villityypin Phaffia rhodozyma-kantoihin, mikä tekee ne sopimattomiksi kaupalliseen fermentaatioon. Täten olisi hyvin edullista kehittää sellaisia Phaffia rhodozyma-kantoja, jotka tuottavat suuria määriä astaksantiinia (µg kohti grammaa solumassaa), koska niillä on myös kasvunopeudet, joita voidaan verrata villityypin Phaffia rhodozymaan (kuten kanta 67-210, joka on yleisesti saatavilla Yhdysvaltojen maatalousosastolta, Nothern Regional Research Center tallennusnumerolla NRRL Y-10921).

Sen lisäksi, että on sopivat Phaffia rhodozyma-kannat kaupallista fermentaatiota varten, Phaffia rhodozyman viljelymenetelmiä tarvitsee kehittää, mikä maksimoi astaksantiinisaannon solumassaa kohti. Kirjallisuus neuvoo tällä hetkellä kasvattamaan Phaffia rhodozymaa kasvua rajoittavalla sokerimäärällä, jotta vältetään sokerin metaboliaa etanoliksi ja asetaldehydiksi, mitä tapahtuu, kun läsnä on ylimääräinen määrä sokeria. Etanolin ja asetaldehydin tuotto Phaffia rhodozyma-viljelmässä on tietysti haitallista, sen suuren myrkyllisyyden takia Phaffia rhodozyma-soluille. Solut, joita on kasvatettu rajoitetulla sokerilla, tuottavat

kuitenkin alhaisemmat määrät astaksantiinia ja vapauttavat sivutuotteita, jotka aiheuttavat ylimääräistä vaahtoamista fermentaatioastioissa. Vaahto vähentää jyrkästi käytettävää fermentaatiomassaa tilavuutta kohti ja sitä täytyy kontrolloida käyttämällä mekaanisia tai kemiallisia keinoja. Sen vuoksi olisi merkittävä parannus tällä hetkellä saatavilla olevalla alalla saada menetelmä Phaffia rhodozyma-solujen viljelemiseksi, mikä ratkaisisi jotkut tai kaikki nämä ongelmat.

Lopuksi, sen jälkeen kun Phaffia rhodozyma-solut on kerätty, täytyy kehittää nopea, taloudellinen menetelmä, millä saadaan solujen sisällä tuotettu astaksantiini helposti saatavana ravintopigmenttilisänä kalalle, äyriäisille ja linnuille (eläimet, jotka eivät kykene rikkomaan, aukaisevat Phaffia soluseinän).

Täten tämän keksinnön tarkoitus on saada Phaffia rhodozyma-kantoja, jotka tuottavat suuria määriä astaksantiinia ja ovat sopivia kaupalliseen fermentaatioon.

Tämän keksinnön tarkoitus on myös saada parantunut menetelmä Phaffia rhodozyman kasvulle, mikä tuottaa korkeita astaksantiinisaantoja.

Tämän keksinnön vielä eräs tarkoitus on antaa menetelmä, jolla tehdään Phaffia rhodozyma-solut, joiden sisällä on astaksantiinia, sopivaksi ravintopigmenttilisäksi kalalle, äyriäisille ja linnuille.

Tämän keksinnön muut näkökohdat, tarkoitukset ja useat edut tulevat selviksi välittömästä yksityiskohtaisesta selvityksestä.

Tämän keksinnön mukaisesti me olemme löytäneet ja eristäneet uudet Phaffia rhodozyma-kannat, jotka tuottavat astaksantiinia noin 45 µg/1/h - noin 100 µg/1/h rajoissa, kun

kasvatetaan sopivissa kasvuolosuhteissa ravistelupullossa.

Tämän keksinnön lisäsuoritusmuodon mukaisesti olemme lisäksi löytäneet ja eristäneet uusia Phaffia rhodozyma-kantoja, jotka tuottavat astaksantiinia noin 400 µg/1/h - noin 962 µg/1/h rajoissa, kun kasvatetaan sopivissa kasvuolosuhteissa fermentorissa.

Eräässä toisessa tämän keksinnön suoritusmuodossa olemme löytäneet menetelmän Phaffia rhodozyma-solujen, jotka tuottavat suuria määriä astaksantiinia, viljelemiseksi, mihin sisältyy:

(a) laitetaan Phaffia rhodozyma-solut kosketuksiin sopivan ravintoalustan kanssa, jotta muodostetaan fermentaatioliemi;

(b) laitetaan mainittu fermentaatioliemi kosketuksiin viljelyn aikana ainakin yhden sopivan hiilenlähteen kanssa ja ylläpidetään mitattavaa mainitun ainakin yhden sopivan hiilenlähteen pitoisuutta, missä ainakin yhden sopivan hiilienergialähteen määrä, joka on kosketuksissa fermentaatioliemen kanssa, ei johda fermentaatioliemessä läsnäolevien Phaffia rhodozyma-solujen kasvua inhiboivan etanolimäärän tuottoon; ja

(c) viljellään mainittua fermentaatiolientä sellaisissa pH-, lämpötila- ja ilmastusolosuhteissa, jotta helpotetaan mainittujen Phaffia rhodozyma-solujen kasvua fermentaatioliemessä ja.

Tämän keksinnön vielä eräässä suoritusmuodossa olemme löytäneet menetelmän saada Phaffia rhodozyma-solut, joissa on astaksantiinia, sellaisessa muodossa, jona astaksantiini on lohen sukuisten, äyriäisten tai lintujen saatavilla astaksantiiniravintolähteenä, mikä koostuu:

(a) saatetaan Phaffia rhodozyma-solut, joissa on astaksantiinia, kosketuksiin tehokkaan määrän kanssa pilkkovaa entsyymivalmistetta Trichoderma harzianum-hiivasta, joka kykenee ainakin osittain pilkkomaan Phaffia rhodozyman

soluseinän.

Phaffia rhodozyman villit kannat voivat tuottaa 30-800 µg astaksantiinia /g hiivaa, riippuen kasvuolosuhteista (Johnson, E. A. ja Lewis, M. J., 1979. J. Gen. Microbiol. 115: 173-183). Koska tälläiset astaksantiinituoton tasot ovat merkittäviä niin, jotta tehtäisiin astaksantiinin kaupallinen tuotto Phaffia rhodozymasta mahdolliseksi, täytyy astaksantiinisaantoihin saada merkittäviä parannuksia.

Astaksantiinituottoa voidaan parantaa Phaffia rhodozyma-kannoissa systemaattisella kannan kehittämisohjelmalla, mihin kuuluu, että hiivasoluja käsitellään mutageenillä ja sitten seulotaan saadut mutanttisolut, jotka kykenevät tuottamaan pesäkkeitä, joissa on korkeammat astaksantiinipitoisuudet. Tälläiseen menetelmään sopivia mutageenejä ovat, mutta ei rajoitu, ultraviolettisäteily, typpihapoke, etyylimetaanisulfonaatti (EMS), dietyylisulfaatti, 1-metyyli-1-nitronitrosoguanidiini (nitrosoguanidiini, NTG), S-bromourasiili, 2-ominopuriini, akridiinioranssi, etidiumbromidi ja kahden tai useamman niiden yhdistelmä. Näitä mutageenejä voidaan käyttää indusoimaan mutaatio Phaffia rhodozymassa seuraamalla samanlaisia protokolleja kuin on kehitetty muille hiivoille tai bakteereille, kuten Saccharomyces cerevisiae tai Escherichia coli. Tällä hetkellä ovat edullisia hiivan mutaatioprotokollat, joissa käytetään nitrosoguanidiinia tai EMS:ää. Ammattimiehet tietävät sopivia tekniikoita hiivojen, kuten Phaffia rhodozyma, mutatointiin, joihin kuuluvat mutta ei rajoitu hiivamutaatiotekniikat, joista keskustellaan teoksessa Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, 1979, Shermal, et al., tai esimerkki 1 kappaleet A-C. Seulontaa voidaan suorittaa visuaalisella tarkastelulla, astaksantiinin uutemäärityksillä ja niiden pesäkkeiden fermentaatiotutkimuksilla, joilla näyttää olevan parantuneet astaksantiinitasot. Mutageenisoiduista Phaffia rhodozyme-pesäkkeistä johdetut kannat pitäisi myös seuloa, jotta varmistetaan, että kannat pitä-

vät halutut ominaisuudet toistuvien fermentaatioiden aikana ja jälkeen.

Phaffia rhodozyma-kantojen, joilla on merkittävästi parantuneet astaksantiinin tuottotasot ja halutut ominaisuudet, kehittämiseksi ovat monet mutageneesien ja seulomisien kierrot tarpeellisia. Valitettavasti jokainen mutageneesikierros tuotti itsenäisesti uuden ryhmän mutantteja, joilla on kasvavassa määrin alhaisempi todennäköisyys antaa parantuneita Phaffia rhodozyma-kantoja. Lisäksi jokainen mutageneesikierros lisäsi todennäköisyyttä että ei-toivottuja mutaatioita tapahtuisi aiheuttaen harvempien kantojen osoittaa parantunutta astaksantiinituottoa ja säilyttää halutut kasvuominaisuudet. Lukuisien mutaatiokiertojen jälkeen useat kannat, jotka näyttivät olevan runsaasti astaksantiinia tuottavia maljaseulonnassa, osottautuivat tuottamaan alhaisia astaksantiinitasoja, ei-hyväksyttäviä vaahtotasoja tai alhaiset kasvunopeudet fermentaation aikana. Seuraavat kannat mutatoitiin nitrosoguanidiinilla tai EMS:llä tai niiden yhdistelmällä ja osoittivat merkittävästi parantuneita astaksantiinin tuottotasoja ja samalla pitämällä toivotut fermentaatio-ominaisuudet.

Taulukko 1

Phillips kantakokoelma nr.	NRRL nr.	Astaksantiinisisältö[1] µg/g DCW[4]	Astaksantiinituottavuus[2] µg/l/hr[3]
PC 8055*	Y-10291	530	43,2
PC 8059[5]	Y-18549	726	79
PC 8065[5]	Y-18550	720	56
PC 8071[5]	Y-18554	977	58
PC 8075[5]	Y-18555	1681	98
PC 8077[5]	Y-18556	1345	47
PC 8088[5]	Y-18551	1622	81
PC 8091[5]	Y-18552	1988	52
PC 8093[5]	Y-18553	1811	55

* Isäntäkanta oli 67-210, tunnettu myös PC 8055:nä, joka on tallennettuna ja yleisölle avoin Yhdysvaltojen Maatalousosastolla, Agricultural Research Service, Northern Regional Research Center, joka sijaitsee Peoriassa, Illinois, tallennusnumerolla NRRL Y-10921.

[1] Astaksantiinisisältö määritettiin esimerkissä 1.C.2 kuvatulla menetelmällä.

[2] Tuottavuus määritettiin HLPC:llä, kuten esimerkissä 1 on kuvattu.

[3] Kannat kasvatettiin ravistelupulloissa kuten esimerkissä 1 C2 on kuvattu. Kantoja kasvatettiin 5 päivää (120 h), sitten kerättiin ja määritettiin.

[4] DCW on lyhennys solun kuivapainolle. Solun kuivapainot määritettiin ottamalla 25 ml näyte lientä ja sentrifugoimalla liemi kunnes solupelletti muodostui. Supernatantti kaadettiin pois ja pelletti suspendoitiin uudestaan deionisoituun veteen, jolloin saatiin liuos, jonka lopullinen tilavuus oli 25 ml. Uudelleen suspendoitu liuos sentrifugoitiin jälleen, kunnes pelletti muodostui. Supernatantti kaadettiin pois ja solupelletti sekoitettiin riittävän määrän kanssa deionisoitua vettä, jolloin muodostui kaadettava suspensio. Suspensio laitettiin alumiiniseen taarauskuppiin. Sentrifuugiputki huuhdeltiin myös, jotta poistetaan kaikki solujäännökset noin 5 ml:lla deionisoitua vettä, joka myös lisättiin kuppiin, jossa oli solususpensiota. Kuppi asetettiin kuivausuuniin 80°C:een 12 h:ksi. 12 h lopulla kuppi punnittiin ja taarapaino vähennettiin, jolloin saatiin solun kuivapaino.

[5] Eristetyt, olennaisesti Phaffia rhodozyman puhdaskannat, joilla on vastaavat NRRL-numerot, on tallennettu Yhdysvaltojen Maatalousosastolle, Agricultural Research Service, Northern Regional Research Center, 1815 North University Street, Peoria, Illinois 61604, Budapestin sopimuksen ehdoilla.

Löydettäessä Phaffia rhodozyma-kannat PC 8059, PC 8065, PC 8071, PC 8075, PC 8077, PC 8088, PC 8091 ja PC 8093 kasvu astaksantiinin tuottavuudessa johtuu kohonneista astaksantiinin tuottotasoista kytkeytyneenä nopeaan solun kasvunopeuteen. Näiden kantojen kohonneet astaksantiinin tuotot sopivissa kasvuolosuhteissa ovat noin 45 µg/l/h - noin 100 µg/l/h rajoissa astaksantiinia kuivapainopohjalla, kun kasvatettu ravistelupulloissa. Näiden kantojen edullinen astaksantiinin tuottavuus edellä kuvatuissa olosuhteissa on noin 55 µg/l/h - 100 µg/l/h rajoissa kuivapainopohjalla ja edullisimmin noin 78 µg/l/h - noin 100 µg/l/h rajoissa astaksantiinia kuivapainopohjalla. Sopivat kasvuolosuhteet ravistelupullossa on kuvattu olosuhteina, jotka ovat välttämättömät, jotta saadaan maksimaalinen spesifinen kasvunopeus Phaffia rhodozyma-kannalle, jota kasvatetaan ravistelupullossa, jota ravistellaan voimakkaasti 5 päivää kasvun jälkeen. Tämän keksinnön Phaffia rhodozyma-kantojen sopiviin kasvuolosuhteisiin ravistelupullossa kuuluu, että käytetään rikasta kasvumääritysalustaa, kuten esimerkeissä kuvataan, ja kasvatetaan kantaa 20°C-22°C:ssa voimakkaasti ravistellen.

Näillä Phaffia rhodozyma-kannoilla on samalla lailla myös kohonnut astaksantiinituottavuus panos-syöttöfermentaatioolosuhteissa. Näiden kantojen astaksantiinin tuottavuuden nousu sopivissa kasvuolosuhteissa on noin 400 µg/l/h - noin 969 µg/l/h rajoissa astaksantiinia kuivapainopohjalla, kun kasvatetaan panos-syöttöfermentaatiotavalla sopivassa fermentaatioastiassa. Näiden kantojen astaksantiinin tuottavuuden nousu sopivissa kasvuolosuhteissa on edullisesti noin 480 µg/l/h - noin 962 µg/l/h rajoissa astaksantiinia kuivapainopohjalla, kun kasvatetaan panos-syöttöfermentaatiotavalla sopivassa fermentaatioastiassa. Sopivia kasvuolosuhteita panos-syöttökasvulle sopivassa fermentaatioastiassa kuvataan olosuhteiksi, jotka tarvitaan, jotta saadaan kasvatettavana olevalle Phaffia rhodozyma-kannalle maksimaalinen spesifinen kasvunopeus. Tämän keksinnön

Phaffia rhodozyma-kannoille sopiviin kasvuolosuhteisiin kuuluu, kun kasvatetaan panos-syöttötavalla, fermentaatioastian ymppääminen tuoreella ympillä, sopivaan fermentaatioastiaan (kuten 20 l Bio Lafitte fermentaatioastia), missä fermetaatioliemi on Bio Lafitte-alustaa, joka on kuvattu esimerkeissä, pH ylläpidetään 4,5-5,5 ja lämpötila ylläpidetään 19°C-21°C, liuenneen hapen sisältö ylläpidetään 30 % - 80 % kyllästyksessä ja mitattava glukoosisisältö ylläpidettiin noin 1 g/l - noin 3 g/l rajoissa 24 h:iin asti ennen kuin fermentaatio oli valmis.

Tällä hetkellä edullinen kanta astaksantiinin tuottoon on PC 8059 NRRL Y-18549-kanta sen astaksantiinin tuottotason ja erittäin toivottujen kasvuominaisuuksien takia.

Phaffia rhodozyma on suhteellisen uusi organismi käytettäväksi teollisessa fermentaatiossa. Useat työntekijät Phaffia rhodozyma-fermentaatioalalta ovat huomanneet, että alkoholi ja aldehydit kerääntyvät Phaffialle myrkyllisiin tasoihin asti, jos saatavilla on ylimäärä hiilienergialähdettä sokerin muodossa. Tämä on johtanut nämä työntekijät ehdottamaan, että Phaffia rhodozyma-soluja kasvatetaan olosuhteissa, missä annetun hiilienergianlähteen määrä rajoittaa kasvuolosuhteita. Phaffia rhodozyma vastaa kuitenkin hiilienergialähteen rajoittamiseen tuottamalla alhaisempia astaksantiinisaantoja ja vapauttamalla yhdisteitä, jotka aiheuttavat ylimääräistä vaahtoamista fermentaatioastiassa. Näiden vaahtoa aiheuttavien yhdisteiden läsnäolo tekee vaahdonestoaineiden käytön välttämättömäksi fermentaatioastian ylitsevaluvuuden välttämiseksi. Valitettavasti vaahdonestoaineiden käyttö voi vielä lisää vähentää solukohtaisia astaksantiinisaantoja.

Me olemme kuitenkin huomanneet, että ylläpitämällä ainakin yhden sopivan hiilienergialähteen mitattava ylimäärä fermentaatioliemessä, jossa on vesipitoisia Phaffia rhodozyma-soluja ja ravinteita, voidaan alkoholin ja aldehydin tuot-

toa helposti kontrolloida ja vaahtoamista välttää. Lisäksi ainakin yhden sopivan hiilienergialähteen mitattavan ylimäärän läsnäolo johtaa myös kasvaneisiin solukasvunopeuksiin ja astaksantiinisaantoihin.

Erityisen tärkeätä parannettaessa astaksantiini- ja solusaantoja on ylläpitää ainakin yhden sopivan hiilienergialähteen mitattava ylimäärä, koska Phaffia rhodozyma-solut ovat siirtymävaiheessa ymppäämisen ja logaritmisen kasvufaasin välillä. Phaffia rhodozyma-solut laitetaan edullisesti kosketuksiin ainakin yhden sopivan hiilienergialähteen mitattavan ylimäärän kanssa alkaen siirtymävaiheesta läpi suuren osan logaritmista kasvufaasia.

Annetun ainakin yhden sopivan hiilienergialähteen mitattava ylimäärä pitäisi olla tehokas määrä välttämään ylimääräistä vaahtoamista Phaffia rhodozyma-fermentaation aikana eikä myöskään pitäisi johtaa kasvua repressoivien tai myrkyllisten alkoholi- tai aldehyditasojen syntymiseen. Ainakin yhden sopivan hiilienergialähteen mitattava ylimäärä, joka havaitaan fermentaatioliemessä, jossa on vesipitoisia Phaffia rhodozyma-soluja ja ravinteita, on edullisesti noin 1,0 g/l - noin 20,0 g/l rajoissa ja edullisimmin noin 1 g/l - noin 5 g/l. Ainakin yhden sopivan hiilienergialähteen mitattavan ylimäärän määrää fermentaatioliemessä pitäisi kontrolloida, jotta vältettäisiin ylimääräistä alkoholi- tai aldehydituottoa. Alkoholin määrä fermentaatioliemessä on edullisesti noin 0,0 g/l - noin 3,0 g/l rajoissa. Aldehydin määrä fermentaatioliemessä on edullisesti noin 0,0 g/l - noin 0,1 g/l rajoissa.

Phaffia rhodozyman fermentaatio voidaan suorittaa vesipitoisella jatkuvalla tai panos-syöttötavalla käyttämällä erilaisia hiilienergialähteitä ja/tai ravintolähteitä. Sopivia hiilienergialähteitä kasvavalle Phaffia rhodozymalle on mutta ei rajoitu hiilienergialähteeseen, joka valitaan ryhmästä, joka koostuu sukkinaatista, malaatista, puryvaa-

tista, glukoosista, sukroosista, fruktoosista, maltoosista, maissisiirapista, hydrolysoidusta tärkkelyksestä, tärkkelyksestä ja minkä tahansa niiden kahden tai useamman yhdistelmästä. Edulliset hiilienergialähteet kasvavalle Phaffia rhodozymalle on hiilienergialähteet, joka valitaan ryhmästä, joka koostuu sukkinaatista, glukoosista ja niiden yhdistelmistä. Phaffia rhodozyman sopivaan ravintolähteeseen tai alustaan kuuluisi ainakin yksi typpilähde, ainakin yksi fosfaattilähde, ainakin yksi mineraalin lähde, kuten rauta, kupari, sinkki, magnesium, mangaani, kalsium ja muut hivenaineet ja vitamiinit (kuten biotiini, pantoteenihappo ja tiamiini kuten vaadittu).

Sopivia lähteitä ainakin yhdelle hiilienergialähteelle ja ravinteille voidaan saada erilaisista lähteistä tai voi koostua yksittäisestä lähteestä, kuten ruokomelassi. Edullisia ovat kuitenkin ainakin yksi hiilienergialähde ja/tai ravinnelähteet, joilla on määritetty luonne. Yksi hiilienergialähde ja/tai ravinnekoostumus, joka on osottautunut tehokkaaksi, on:

Taulukko 2

Hiilienergialähde ja ravinteet

Komponentti/l vettä

Hiilienergialähde	10 - 100 (g/l)
H_3PO_4 (85 %)	0,16 - 2,7 (ml/l)
$CaSO_4x2H_2O$	0,011 - 0,8 (g/l)
K_2SO_4	0,171 - 1,3 (g/)
$MgSO_4x7H_2O$	0,140 - 1,56 (g/l)
KOH	0,047 - 0,35 (g/l)
Biotiini	0,006 - 0,044 (mg/l)
Tiamiini	0,12 - 9,8 (mg/l)
[1]Hiivauutteet	1,2 - 6,0 (g/l)
[2]Mineraalit ja hivenmetalli	0,118 - 9,8 (mg/l)

[1]Hiivauute on Amberex™ 1003, jota on saatavilla Universal Foods Corporationista ja heidän tavaramerkkinä, Milwaukee, Wisconsin.

[2]Mineraalit ja hivenmetallit ovat $FeSO_4x7H_2O$ 65,0 g/l, $CuSO_4x5H_2O$ 6,0 g/l, $ZnSO_4x7H_2O$ 20 g/l, $MnSO_4$ 3,0 g/l ja H_2SO_4 5,0 ml/l

Tässä keksinnössä käytetyt hiivauutteet ovat mutta eivät rajoitu hiivauutteisiin, jotka valikoidaan ryhmästä, joka koostuu Amberex™ 1003 ja Bacto™ Yeast Extract (Difco laboratories Incorporated). Vaihtoehtoisesti maissin liotusvettä voitaisiin käyttää korvaamaan hiivauutteet typpilähteenä.

Tässä keksinnössä käytetyt hivenmetallit ovat niitä hivenmetalleja, joita yleensä käytetään hiivakasvussa määränä, joka on riittävä ettei rajoita Phaffia rhodozyman kasvunopeutta tai astaksantiinituottoa, joihin kuuluvat, mutta ei rajoitu, hivenmetallit, jotka valitaan ryhmästä, joka koostuu koboltista, molybdeenistä, raudasta, kuparista, sinkistä ja mangaanista.

Fermentaatiolämpötilan pitäisi yleensä vaihdella noin 18°C - noin 22°C:een välillä ja edullisesti pitäisi olla noin 20°C.

Liuenneen hapen sisältö fermentaatioastiassa, jossa fermentaatio tapahtuu panos-syöttötavalla, saattaa vaihdella noin 10 % - noin 80 % kyllästykseen ja edullisesti vaihtelee noin 30 % - noin 60 % kyllästykseen. Liuenneen hapen sisältö jatkuvassa fermentaatiossa pitäisi vaihdella noin 70 % - noin 100 % kyllästykseen ja edullisesti pitäisi olla noin 70 % - noin 80 % kyllästyksen rajoissa. pH, jossa Phaffia rhodozyma-solut viljellään, pitäisi vaihdella noin 3,0 - noin 5,5 ja edullisesti pH vaihtelee noin 4,5 - noin 5,4.

Sen jälkeen, kun fermentaatioliemi, jossa Phaffia rhodozyma-solut ovat, on saavuttanut halutun solutiheyden tai astaksantiinisisällön, voidaan solut kerätä. On edullista, että Phaffia rhodozyma-viljelmä voidaan pitää stationäärifaasissa noin 4 - noin 24 h rajoissa ja edullisimmin noin 8 - noin 12 h rajoissa astaksantiinisaannon lisäämiseksi.

Phaffia rhodozymaa ei kuitenkaan pitäisi pitää jatkettua aikajaksoa stationäärifaasissa, koska Phaffia rhodozyma-

solut muodostavat paksut soluseinät, mikä on haitallista astaksantiinin, jota on niissä soluissa sopivassa muodossa käytettäväksi ravintopigmenttilisänä, saannille.

Lohen sukuiset, äyriäiset ja linnut eivät voi käyttää astaksantiinia rikkomattomista Phaffia rhodozyma-soluista. Jotta Phaffia rhodozymaa käytetään astaksantiinin ravintolähteenä, täytyy Phaffia rhodozyman soluseinät rikkoa fysikaalisin, kemiallisin, mekaanisin tai entsymaattisin keinoin. Phaffia rhodozyma soluseinät ovat hyvin resistentteja normaalissa lyysausprotokollassa. Esimerkiksi helmijauhaminen vapauttaa vain noin 40 % astaksantiinista, jota on Phaffia rhodozyma-soluissa, kolmen helmimyllyn läpimenokerran jälkeen (useammat helmimyllyn läpäisyt eivät olennaisesti lisää astaksantiinin vapautumista). Gualin puristin vapauttaa noin 95 % Phaffia rhodozymassa olevasta astaksantiinista, mutta vain kolmen Gualin puristimen läpimenokerran jälkeen (mikä on aikaa vievää ja vaatii merkittävät pääomamenot). Phaffia rhodozyman entsymaattinen lyysaus ei myöskään osottautunut taloudelliseksi tai tehokkaaksi vapauttamaan astaksantiinia Phaffia rhodozymasta ennen tätä keksintöä.

Olemme havainneet, että tehokas määrä pilkkovaa entsyymivalmistetta Trichoderma harzianum-homeesta kykenee pilkkomaan Phaffia rhodozyman soluseinää. Tämä johtaa melkein täydelliseen Phaffia rhodozymassa olevan astaksantiiniin saamiseen kun määritetään vertaamalla asetoniuuttoon, joka on kuvattu esimerkissä 1.C.2. Taulukko 7 esimerkissä 3 vertailee Mutanaasia™ (Novo-entsyymien tavaramerkki), Trichoderma harzianumin pilkkova uute, useita muita kaupallisia entsymaattisia uutteita vastaan. Taulukko 7 osoittaa, että erittäin pienet määrät Trichoderma harzianum pilkkovaa entsyymivalmistetta (Mutanaasi™) vapautti olennaisesti kaiken Phaffia rhodozymassa olleen astaksantiinin.

Sopivia Trichoderma harzianum-kantoja on yleisesti saatavilla American Type Culture Collectionista, 12301 Parklawn

Drive, Rockville, Maryland (kuten ATCC-64986). Näitä kantoja voidaan viljellä ja stimuloida tuottamaan pilkkovia entsyymejä submerssiviljelmäfermentaatiolla, kuten ammattimiehet tietävät. Yksi sopiva lähde Trichoderma harzianum pilkkoville entsyymivalmisteille on Novo Enzymes SP-299-Mutanase.

Phaffia rhodozyma-soluja, joissa on astaksantiinia, pitäisi käsitellä tehokkaalla määrällä Trichoderma harzianum pilkkovaa entsyymivalmistetta, jotta päädyttäisiin olennaisesti kaiken siellä olevan astaksantiinin saamiseen. Yleensä pilkkovan entsyymivalmisteen määrä kohti 100 g/l vesipitoista Phaffia rhodozymaa on riippuvainen lämpötilasta, pH:sta ja käytettyjen Phaffia rhodozyma-solujen tilasta, suuntaviivana suositellaan käytetyn Phaffia rhodozyman määrän vaihtelevan noin 0,2 yksiköstä noin 10 yksikköön Trichoderma harzianum pilkkovaa entsyymivalmistetta käytettäväksi kohti 100 g/l. Yksikkö määritetään sellaiseksi määräksi Trichoderma harzianum pilkkovaa entsyymiä, joka antaa vastaavan määrän vapautunutta astaksantiinia kuin asetoniuutto, joka on kuvattu esimerkissä 1.C.2., vesipitoisen Phaffia rhodozyman päällä, josta on poistettu 100 g/l tiheys, koska logaritmisessa kasvufaasissa, kun pilkkova entsyymi saatetaan kosketuksiin Phaffia rhodozyma-solujen kanssa 22°C:ssa ja pH 4,5 ja annetaan inkuboitua 24 h.

Lämpötila, jossa Phaffia rhodozyma-solut saatetaan kosketuksiin pilkkovan entsyymivalmisteen kanssa, voi olla mikä tahansa lämpötila, joka saallii pilkkovan entsyymin pilkkoa Phaffia rhodozyma-soluseinät. Yleensä lämpötilojen pitäisi vaihdella noin 0°C:sta noin 60°C:een. Tämän keksinnön käytännölle ovat edullisia lämpötilat noin 20°C - noin 30°C rajoissa.

pH, jossa Phaffia rhodozyma-solut saatetaan kosketuksiin pilkkovan entsyymivalmisteen kanssa, voi olla mikä tahansa sopiva pH, joka sallii pilkkovan entsyymivalmisteen pilkkoa

Phaffia rhodozyman soluseinät. Yleensä pH:n, jossa Phaffia rhodozyma-solut saatetaan kosketuksiin pilkkovan entsyymivalmisteen kanssa, pitäisi vaihdella noin pH 4,0 - noin pH 5,5 ja edullisesti olla noin pH 4,5 - noin 5,0 rajoissa.

Phaffia rhodozyma-solut, joissa on astaksantiinia, voidaan saattaa kosketuksiin pilkkovan entsyymivalmisteen kanssa, joka on saatu Trichoderma harzianumista minä aikana tahansa Phaffia rhodozyman elinkierron aikana. On kuitenkin edullista, että Phaffia rhodozyma-solut saatetaan kosketuksiin pilkkovan entsyymivalmisteen kanssa niin pian kuin mahdollista sen jälkeen, kun Phaffia rhodozyma-solut ovat logaritmisessa kasvuvaiheessa, edullisesti noin 0 h - noin 72 h rajoissa logaritmisen kasvufaasin jälkeen ja edullisimmin noin 0 h - noin 24 h rajoissa.

Vesipitoisen Phaffia rhodozyma-suspension ja Trichoderma harzianum pilkkovan entsyymivalmisteen sekoittaminen voidaan suorittaa millä tahansa sopivalla keinolla sekoitus suoritetaan yleensä saattamalla kuiva pilkkova entsyymivalmiste kosketuksiin vesipitoisen Phaffia rhodozyman fermentaatioliemen tai vesipitoisen solususpension kanssa ja lisäämällä mainittu kuiva pilkkova entsyymivalmiste liuokseen.

Pilkkova entsyymivalmiste, joka on saatu Trichoderma harzianumista, voidaan saattaa kosketuksiin Phaffia rhodozyma-solujen kanssa, joissa on astaksantiinia, sellaiseksi aikamääräksi, joka on tehokas johtamaan Phaffia rhodozyma-soluissa läsnäolevan astaksantiinin olennaiseen vapautumiseen, kun verrataan asetoniuuttoon, kuten esimerkissä 1 kuvataan. Ajan määrä riippuu solukonsentraatiosta, pH:sta, lämpötilasta ja käytetyn pilkkovan entsyymivalmisteen yksiköistä. Yleensä ajan, joksi Phaffia rhodozyma-solut saatetaan kosketuksiin Trichoderma harzianumista saadun pilkkovan entsyymivalmisteen kanssa, pitäisi olla noin 12 h - noin 24 h rajoissa, edullisesti kosketuksiin saattamisaika

on noin 24 h.

Phaffia rhodozyma-solut voidaan kuivata sen jälkeen kun ne on rikottu tai pilkottu tavalla, joka tekee niissä olleen astaksantiinin saatavaksi käyttöön ravintopigmenttilisänä. Kuivaaminen voidaan suorittaa käyttämällä leijukuivatinta, kuivausrumpua tai sumutuskuivuria. Sumutuskuivuri on tällä hetkellä edullinen lyhyen altistamisen takia korkeille lämpötiloille, jotka voisivat hapettaa/hajottaa läsnäolevan astaksantiinin.

Sumutuskuivaus pitäisi suorittaa rikottujen Phaffia rhodozyma-solujen suspensiolle tai pilkotuille Phaffia rhodozyma-soluille. Jos suspensio on muodostunut Phaffia rhodozyma-solujen päälle, jotka on pilkottu pilkkovalla entsyymivalmisteella, solupinnoilta suspensio pitäisi pestä pois, jotta poistetaan kaikki jäännökset, jotka olisivat tapuivaisia tekemään solut tahmeiksi. Solususpension peseminen voidaan suorittaa millä tahansa ammattimiehen tuntemalla sopivalla tekniikalla. Suspensio voidaan valinnaisesti sekoittaa antioksidanttien, kuten butyylihydroksitolueeni (BHT), butyylihydroksianisoli (BHA) tai askorbiinihappo tai emulgoimisaineet, kuten sorbitaalimonostearaatti, kanssa. Suspensio pitäisi sitten laittaa sumutuskuivurin sisäänmenoon, jossa pitäisi olla lämpötila vaihdellen noin 218°C - noin 274°C ja edullisesti noin 227°C - noin 266°C. Kriittinen parametri, jota pitäisi tarkkailla, jotta kontrolloidaan suspension sisäänmenonopeutta, on sumutinkuivurin ulostulon lämpötila pitäisi pitää noin 71°C - noin 96°C ja edullisesti noin 77°C - noin 88°C. Kuivauksen jälkeen saatu tuote on jauhemainen hiivamateriaali, joka voidaan saattaa entiselleen millä tahansa sopivalla keinolla, kuten pyörresuppilo, ja käsitellä lisää käytettäväksi rehussa, varastoinnissa tai laivauksessa.

Seuraavat ei-rajoittavat esimerkit annetaan kuvaamaan lisää tämän keksinnön käytäntöä.

Esimerkit

Kannat

Phaffia rhodozyma PC 8055	NRRL Y-10921
Phaffia rhodozyma PC 8059	NRRL Y-18549
Phaffia rhodozyma PC 8065	NRRL Y-18550
Phaffia rhodozyma PC 8088	NRRL Y-18551
Phaffia rhodozyma PC 8091	NRRL Y-18552
Phaffia rhodozyma PC 8093	NRRL Y-18553
Phaffia rhodozyma PC 8071	NRRL Y-18554
Phaffia rhodozyma PC 8075	NRRL Y-18555
Phaffia rhodozyma PC 8077	NRRL Y-18556

Alusta, puskurit ja liuokset

YEPD	1 % Bacto hiivauute 2 % Bacto peptoni 2 % Dekstroosi
Sitraattipuskuri	pH 5,5 0,1 M
Fosfaattipuskuri	pH 4,5 0,1 M 20 % polyetyleeniglykoli (PEG - 3350)

Rikas kasvumääritysalusta

Bacto hiivauute	9,0 g/l
Difco mallasuute	6,0 g/l
Dekstroosi	10,0 g/l
KH_2HPO_4	15,0 g/l
K_2HPO_4	1,0 g/l
$MgSO_4x7H_2O$	0,5 g/l
$CaSO_4x2H_2O$	0,04 g/l
$(NH_4)_2SO_4$	3,0 g/l
$FeSO_4x7H_2O$	16,25 mg/l
$CuSO_4x5H_2O$	1,5 mg/l
$ZnSO_4x7H_2O$	5,0 mg/l
$MnSO_4xH_2O$	0,75 mg/l

	Biotiini	0,05 mg/l
	Tiamiini	1,00 mg/l
	Vesi	1 l
	pH säädetään 5,0:ksi NaOH:lla tai H_3PO_4:lla	
Mukaeltu YMA alusta	Bacto hiivauute	6 g/l
	Difco Mallasuute	6 g/l
	Dekstroosi	20 g/l
	Agari	20 g/l
	Vesi	1,0 l
Minimaali fermentori		
Syöttö/FM-21	10 % Hiilenlähde	
	H_3PO_4 85 %	3,5 ml/l
	$CaSO_4x2H_2O$	0,15 g/l
	K_2SO_4	2,38 g/l
	$MgSO_4$ $7H_2O$	1,95 g/l
	KOH	0,65 g/l
	YTM-4	1 ml/l
	Vesi	1 l
	pH säädetään 5,0:ksi NH_3:lla tai NH_4OH:lla	
IM3 suola-alusta	KH_2PO_4	15,0 g/l
	K_2HPO_4	1,0 g/l
	$MgSO_4x7H_2O$	0,5 g/l
	$CaSO_4x2H_2O$	0,04 g/l
	$(NH_4)_2SO_4$	3,00 g/l
	Biotiini	0,05 mg/l
	Vesi	1 l
	pH 5,4	
Bio Lafitte alusta	H_3PO_4 (85 %)	14,5 ml/l
	$CaSO_4x2H_2O$	0,60 g/l
	K_2SO_4	9,12 g/l
	$MgSO_4x7H_2O$	7,60 g/l

KOH	2,60 g/l
glukoosi	40 g/l
hiivauute	20 g/l
hivenmetallit	4,0 ml/l
biotiini	8 mg/l
tiamiini	8 mg/l
STRUKTOL J867 tai Mazu DF 37C	12 tippaa/l
vesi	1 l
pH säädetään 5,0:ksi NH_3:lla	

[1]hivenmetallit sisältävät (YTM-4):

$FeSO_4x7H_2O$	16,25 g/250 ml
$CuSO_4x5H_2O$	1,50 g/250 ml
$ZnSO_4x7H_2O$	5,00 g/250 ml
$MnSO_2xH_2O$	0,75 g/250 ml
H_2SO_4	1,25 g/250 ml
vesi	1 l

Vitamiiniseos

US F&WS nr. 30	A vitamiini	1,653,450 I.U./kg
	D_3 vitamiini	110,230 I.U./kg
	E vitamiini	88,184 I.U./kg
	B_{12} vitamiini	5,5 mg/kg
	riboflaviini	13,228 mg/kg
	niasiini	55,115 mg/kg
	d-pantoteenihappo	16,455 mg/kg
	menadioni	902 mg/kg
	foolihappo	2,205 mg/kg
	pyridoksiini	6,349 mg/kg
	tiamiini	8,102 mg/kg
	d-biotiini	88 mg/kg

Mineraaliseos

US F&WS nr. 3	sinkki	15436 mg/kg
	magneesi	4131 mg/kg
	kupari	317 mg/kg
	jodi	2043 mg/kg

Esimerkki 1

Parannettujen Phaffia rhodozyma-kantojen kehitys

Käytettiin seuraavia menetelmiä kantojen PC 8059, PC 8065, PC 8075, PC 8077, PC 8088, PC 8091 ja PC 8093 kehittämiseen.

A. Phaffia rhodozyman NTG-mutageneesi

Phaffia rhodozyma siirrostettiin 50 ml:aan YEPD:tä 250 ml:n Erlenmeyer-pullossa ja inkuboitiin ravistelijassa 48 h 20°C:ssa. Sitten solut sentrifugoitiin steriileissä 30 ml putkissa 12000 x g 4°C:ssa 10 min ja pestiin 2 kertaa 30 ml:lla steriiliä, pH 5,5 sitraattipuskuria. Solupelletti suspendoitiin uudestaan 27 ml:aan steriiliä pH 5,5 sitraattipuskuria ja lisättiin 3 ml 1 mg/ml NTG:tä (pH 5,5 sitraattipuskurissa). Sitten solususpensiota inkuboitiin 15 min huoneenlämpötilassa ilman ravistelua. Suspensio sentrifugoitiin 12000 x g 4°C:ssa 5 min ja pestiin sitten 2 kertaa steriilillä deionisoidulla vedellä. Sitten solut suspendoitiin uudestaan 30 ml:aan YEPD:tä 250 ml:n Erlenmeyer-pullossa ja inkuboitiin ravistelijassa 20 min 20°C:ssa. Käyttämällä steriiliä 0,1 M $MgSO_4$:aa solut laimennettiin 1/100 ja maljattiin 0,1 ml 20 YEPD-maljalle. Sitten maljoja inkuboitiin 20°C:ssa 10 päivää. 10 päivän kuluttua maljat laskettiin ja mutantit laskettiin.

B. Phaffia rhodozyman EMS-mutageneesi

Phaffia rhodozyma siirrostettiin 50 ml:aan YEPD:tä 250 ml:n Erlenmeyer-pullossa ja inkuboitiin ravistelijassa 20°C:ssa 2 päivää. Solut sentrifugoitiin steriileissä 30 ml putkissa 12000 x g 4°C:ssa 10 min. Sitten pelletti pestiin 2 kertaa 30 ml:lla steriiliä, pH 5,5 sitraattipuskuria. Laitettiin 0,9 ml solususpensiota jokaisen 13 steriilin 1,5 ml:n kartiopohjaiseen polypropyleenimikrosentrifuugiputkiin ja li-

sättiin 75 µl EMS:ää (etyylimetaanisulfonaattia) jokaiseen putkeen. Yksi putki poistettiin välittömästi, sentrifugoitiin mikrosentrifuugilla solujen pelletoimiseksi, pestiin 2 kertaa 1,0 ml:lla steriiliä deionisoitua vettä, suspendoitiin uudestaan 1,0 ml:aan steriiliä deionisoitua vettä ja pidettiin jäissä laimennusaikaan asti. Tämä vaihe toistettiin joka 5 min seuraaville putkille (60 min asti kokonaisaltistus EMS:lle). Kaikki putket laimennettiin sitten 10^2, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6 ja 10^7 kertaa steriiliin 0,1 M $MgSO_4$:ään ja 0,1 ml jokaista laimennusta maljattiin 2 YEPD-maljoille. Kaikkia maljoja inkuboitiin 20°C:ssa 10 päivää. 10 päivän kuluttua maljat laskettiin ja mutantit merkittiin.

C. Seulomisprosessi

1. Astaksantiinin maljamääritys

a. Phaffia rhodozyman kasvu maljoilla

Modifioidut YMA-maljat levitettiin viljelmillä testiä varten ja inkuboitiin 20-22°C aerobisesti. 4 päivän kuluttua kaavittiin yksi tai kaksi isoa pesäkettä (0,1-0,2 grammaa nettopaino) käyttämällä steriiliä siirrotustikkua tai silmukkaa jokaiselta modifioidulta YMA-maljalta. Solut suspendoitiin uudestaan 1,0 ml:aan deionisoitua, tislattua vettä ja laitettiin 2,0 ml kartiopohjaiseen polypropyleenimikrosentrifuugiputkeen.

b. Astaksantiinin asetoniuutto

0,1 ml jokaista solususpensiota pipetoitiin 9,9 ml:aan deionisoitua, tislattua vettä ja absorptio mitattiin 600 nm:ssä solukonsentraation määrittämiseksi (grammoina pestyä solukuivapainoa litraa kohti) tällä menetelmällä, alkuperäisen solukonsentraation 15 g/l absorptio 600 nm:n aallonpituudella (käyttämällä 1 cm valon kulkumatkaa) on 0,550. Mittaus on lineaarinen mittausalueella 0,000-1,000 tai 0-27 g/ml soluja.

Alkuperäinen solususpensio (0,9 ml tilavuus) pelletoitiin sitten mikrosentrifuugissa 14000 x g 4°C:ssa ja supernatanti heitettiin pois. Lisättiin asetonia, jolloin kokonaistilavuudeksi saatiin 1,0 ml. Lisättiin 0,25 g 450-500 mikronin lasihelmiä ja ravisteltiin voimakkaasti ainakin 10 min kokonaisajalla (jaksottaisia jäähdytysvälejä jäissä). 10 min kuluttua ravistelun olisi pitänyt johtaa olennaisesti kaikkien läsnäolevien Phaffia rhodozyma-solujen rikkoutumiseen, mikä pitäisi varmistaa mikroskooppisesti. Jos rikkoutuminen ei ole olennaisesti täydellinen, pitäisi helmijauhamisprosessi toistaa kunnes riittävä rikkoutuminen tapahtuu. Saatu solujäte ja lasihelmet pelletoitiin mikrosentrifuugissa 14000 x g ja 4°C:ssa. Laimennettiin 0,5 ml supernatanttia 1,5 ml:ksi asetonilla. Sitten absorptio mitattiin 478 nm:ssa.

Astaksantiinikonsentraatio laskettiin seuraavasti:

oletetaan että 1 µg puhtaan astaksantiinin
$A_{478} = 160 \times 10^{-6}$ 1 cm valon kulkumatkalla

Alkuperäisen 1,0 ml solususpension astaksantiinin konsentraatio lasketaan seuraavasti:

$$[\text{astaksantiini}]\ \mu g/l = \frac{A_{478}}{b \times 160 \times 10^{-6}} \times \text{laimennuskerroin}$$

missä b = valon kulkumatkan pituus cm (tavallisesti 1) ja

$$\text{laimennuskerroin} = \frac{1,5\ ml}{0,5\ ml} \times \frac{1,0\ ml}{0,9\ ml} = 3,33$$

Solun astaksantiinikonsentraatio lasketaan sitten seuraavasti:

$$[\text{astaksantiini}]\ \mu g/g\ \text{soluja} = \frac{\text{astaksantiinikonsentraatio}\ (\mu g/l)}{\text{solukonsentraatio}\ (g/l)}$$

2. Astaksantiinin ravistelupullomääritys

a. Phaffia rhodozyman kasvu ravistelupullossa

50 ml:aan rikasta kasvumääritysalustaa 250 ml:n Erlenmeyer-pullossa ympättiin silmukallisella Phaffia-viljelmää 7 päivää vanhasta maljaviljelmästä. Ympättyä pulloa inkuboitiin sitten 20-22'C:ssa ravistellen voimakkaasti. 5 päivän kuluttua jokainen viljelmistä kerättiin.

b. Astaksantiinin asetoni-uutto

Jokainen viljelmä kerättiin sentrifugoimalla 12000 x g 10 min 4'C:ssa solujen pelletoimiseksi. Jokainen pelletti pestiin 2 x 100 ml:lla deionisoitua, tislattua vettä ja lopulta suspendoitiin uudestaan 100 ml:aan deionisoitua, tislattua vettä. 0,1 ml jokaisesta solususpensiosta pelletoitiin 9,9 ml:aan deionisoitua, tislattua vettä ja absorptio mitattiin 600 nm:ssa solukonsentraation määrittämiseksi. Käyttämällä tätä menetelmää on alkuperäisellä 15 g/l solukonsentraatiolla 660 nm:n aallonpituudella (käyttämällä 1 cm valon kulkumatkaa) 0,550 absorptio. Mittaus on lineaarinen absorptioalueella 0,000-1,0000 tai 0-27 g/l soluja.

10 ml jokaista alkuperäistä solususpensiota pelletoitiin ja suspendoitiin uudelleen 1,0 ml:aan deionisoitua, tislattua vettä ja siirrettiin 2,0 ml kartiopohja, polypropyleenimikrosentrifuugiputkeen. Solut pelletoitiin putkessa sentrifugoimalla 14000 x g ja 4'C. Supernatantti heitettiin sitten pois ja lisättiin asetonia, jolloin lopputilavuudeksi saatiin 1,0 ml.

Lisättiin 0,25 g 450-500 mikronin lasihelmiä ja ravisteltiin voimakkaasti ainakin 10 min kokonaisajalla (jaksottaisia jäähdytysvälejä jäissä). 10 min kuluttua ravistelun olisi pitänyt johtaa olennaisesti kaikkien läsnäolevien Phaffia rhodozyma-solujen rikkoutumiseen, mikä pitäisi varmistaa mikroskooppisesti. Jos rikkoutuminen ei ole

olennaisesti täydellinen, pitäisi helmijauhamisprosessi toistaa, kunnes riittävä rikkoutuminen tapahtuu. Lasihelmet ja saatu solujäte pelletoitiin mikrosentrifuugissa 14000 x g ja 4°C. Poistettiin 0,5 ml supernatanttia ja lisättiin 1,0 ml asetonia. Sitten absorptio mitattiin 478 nm:ssa.

Oletetaan että 1 µg puhtaan astaksantiinin $A_{478} = 160 \times 10^{-6}$ 1 cm valon kulkumatkalla

Alkuperäisen 100 ml solususpension astaksantiinin konsentraatio lasketaan seuraavasti:

$$[\text{astaksantiini}]\ \mu g/l = \frac{A_{478}}{b \times 160 \times 10^{6}} \times \text{laimennuskerroin}$$

missä b = valon kulkumatkan pituus cm (tavallisesti) ja

$$\text{laimennuskerroin} = \frac{1{,}5\ \text{ml}}{0{,}5\ \text{ml}} \times \frac{10\ \text{ml}}{1\ \text{ml}} = 0{,}3$$

Solun astaksantiinikonsentraatio lasketaan sitten seuraavasti:

$$[\text{astaksantiini}]\ \mu g/g\ \text{soluja} = \frac{\text{astaksantiinikonsentraatio (µg/l)}}{\text{solukonsentraatio (g/l)}}$$

$$[\text{astaksantiini}]\ \mu g/g\ \text{DCW} = \frac{\text{astaksantiinikonsentraatio (µg/R)}}{\text{solukonsentraatio (g/l) DCW}}$$

Solun kuivapaino (DCW) määritettiin ottamalla 25 ml näytelientä ja sentrifugoimalla liemi, kunnes solupelletti on mudostunut. Supernatantti kaadettiin pois ja pelletti suspendoitiin uudestaan deionisoituun veteen, jolloin saatiin solususpensio, jonka lopullinen tilavuus on 25 ml. Solususpensio sentrifugoitiin jälleen, kunnes solupelletti muodostui. Supernatantti kaadettiin pois ja solupelletti sekoitettiin riittävään määrään deionisoitua vettä, jolloin

muodostui kaadettava suspensio. Suspensio laitettiin alumiiniseen taarauskuppiin. Sentrifuugiputki huuhdeltiin myös kaiken solujäännöksen poistamiseksi noin 5 ml:lla deionisoitua vettä, ja lisättiin myös kuppiin, jossa oli solususpensio. Kuppi laitettiin kuivausuuniin 80°C:een 12 h:ksi. 12 h lopussa kuppi punnittiin ja taarapaino vähennettiin, jolloin saatiin solun kuivapaino.

3. Astaksantiinin HPLC-määritys

5 0,2 ml:n hiivalieminäyttettä, joissa oli 0,05 g/ml hiivaa, kuten mitattiin 600 nm:ssa, laitettiin erikseen 5:een 1,5 ml:n kartiopohjasentrifuugiputkeen. Laskettiin solukonsentraatio käyttämällä alkuperäistä 15 g/l solukonsentraatiota ja absorptiota 0,550 (käyttämällä 1 cm valon kulkumatkaa, olettaen että mittaus on lineaarinen 0-15 g/l konsentraatio). Sitten näytteet sentrifugoitiin mikrosentrifuugissa 14000 x g 5 min 4°C:ssa solujen pelletoimiseksi. Lisättiin 1,0 ml asetonia jokaiseen näytteeseen, samoin kuin 0,25 g lasihelmiä (450-500 mikronin lasihelmiä, jotka oli pesty 10 %:ssa fosforihapossa ja huuhdeltu tislatussa deionisoidussa vedessä ja kuivattu 80°C:ssa). Sitten putkia ravisteltiin voimakkaasti 2 min 4°C:ssa ja sentrifugoitiin mikrosentrifuugissa 14000 x g 10 min 4°C:ssa lasihelmien ja solujätteen pelletoimiseksi. Supernatantti dekantoitiin kaikista putkista 6 drakman (1,77 g) lasiampulliin. Asetonin lisäys ja sekoittaminen ja niitä seurannut sentrifugointi toistettiin, kunnes tällä menetelmällä tuotettu supernatantti oli väritöntä. Supernatantti yhdistettiin ja kuivattiin vetokaapissa pimeässä typpi-ilmakehässä huoneenlämpötilassa. Pigmentti, joka oli jäljellä kuivausprosessin jälkeen, sekoitettiin tasan 5 ml:n kanssa metanolia ja annettiin liueta uudelleen 30 min. Sitten metanolipigmenttiliuos suodatettiin 0,2 mikronin suodattimen läpi. 100 µl pigmenttinäyte ajettiin Waters HPLC:ssä. HPLC ajettiin isokraattisesti metanolin ollessa liuottimena, 2 ml/min virtausnopeus ja pylvästä pidettiin huoneenlämpötilassa.

Detektori asetettiin 478 nm:iin. Pylvästä ajettiin 10 min. Astaksantiinin retentio oli noin 2,6-2,7 min. Näytepiikkialat laskettiin Hewlett Packard 3390A integraatterilla. HPLC:ssä käytetty pylväs oli Walters radial-PAK C18-pylväs (P-N 86342).

Solun astaksantiinikonsentraatio lasketaan sitten seuraavasti:

$$[\text{astaksantiini}]\ \mu g/g\ \text{soluja} = \frac{\text{astaksantiinikonsentraatio}\ (\mu g/l)}{\text{solukonsentraatio}\ (g/l)}$$

$$[\text{astaksantiini}]\ \mu g/g\ \text{DCW} = \frac{\text{astaksantiinikonsentraatio}\ (\mu g/R)}{\text{solukonsentraatio}\ (g/l)\ \text{DCW}}$$

DCW on lyhennys solun kuivapainolle. Solun kuivapainot (DCW) määritettiin ottamalla 25 ml näytelientä ja sentrifugoimalla liemi, kunnes solupelletti on mudostunut. Supernatantti kaadettiin pois ja pelletti suspendoitiin uudestaan deionisoituun veteen, jolloin saatiin liuos, jonka lopullinen tilavuus on 25 ml. Uudellen suspendoitu liuos sentrifugoitiin jälleen, kunnes solupelletti muodostui. Supernatantti kaadettiin pois ja solupelletti sekoitettiin riittävään määrään deionisoitua vettä, jolloin muodostui kaadettava solususpensio. Suspensio laitettiin alumiiniseen taarauskuppiin. Sentrifuugiputki huuhdeltiin myös kaiken solujäännöksen poistamiseksi noin 5 ml:lla deionisoitua vettä, ja lisättiin myös kuppiin, jossa oli solususpensio. Kuppi laitettiin kuivausuuniin 80°C:een 12 h:ksi. 12 h lopussa kuppi punnittiin ja taarapaino vähennettiin, jolloin saatiin solun kuivapaino.

Standardi saatiin liuottamalla 5 mg kiteistä astaksantiinia 100 ml:aan metanolia. Tarkan konsentraation laskemiseksi mitattiin absorptio 478 nm:ssa. 1 % liuoksen ekstinktiokerroin 1 cm:ssä määritettiin olevan 2,350. Standardiliuoksen

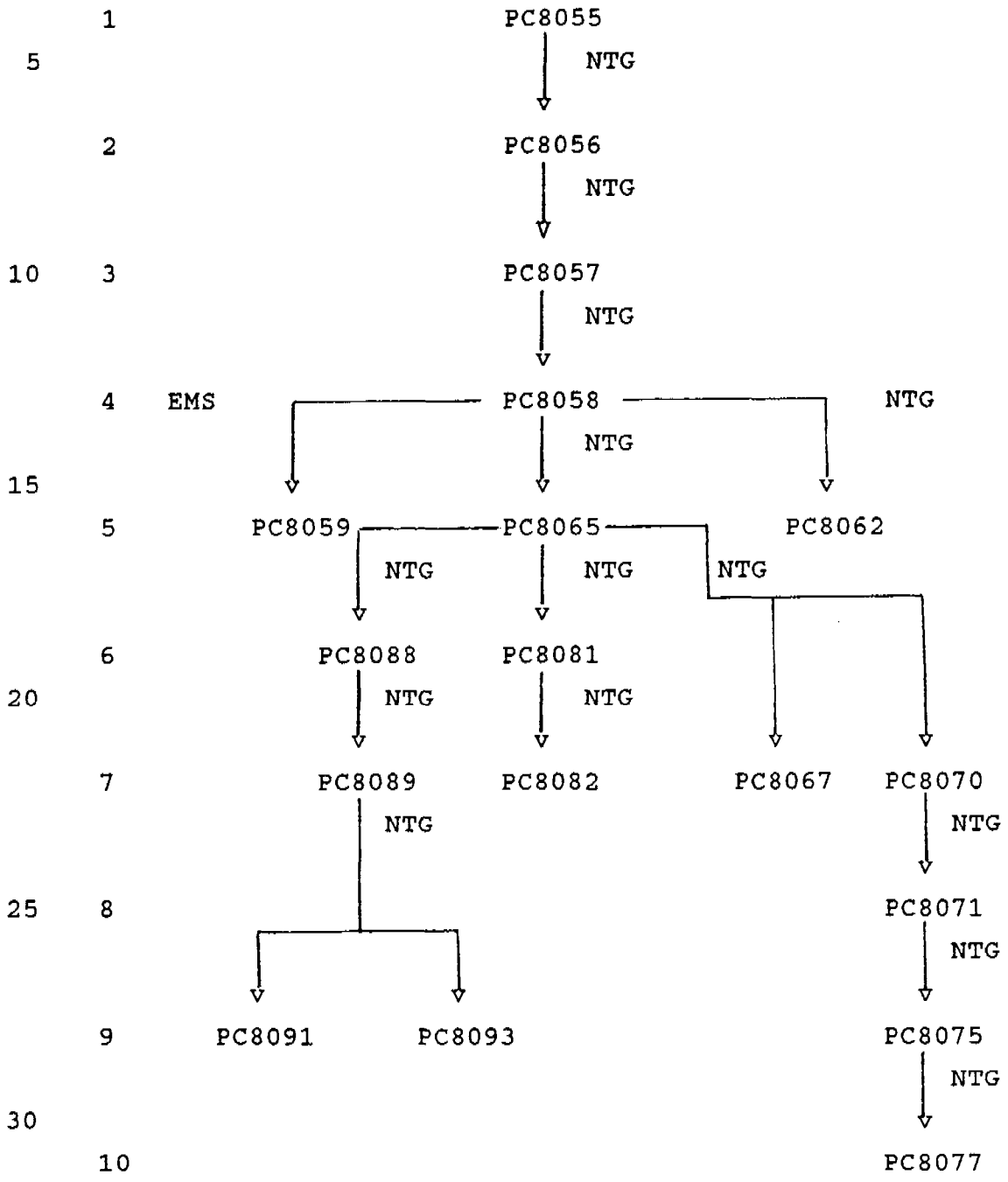
puhtaus varmistettiin ajamalla HPLC-analyysi useilla laimennuksilla. Standardinäytteitä voidaan varastoida 4 viikkoon asti -80°C:n pakastimessa pimeässä.

D. Kantojen kehittäminen

Phaffia rhodozyma-mutantit kehitettiin isäntäkannasta PC 8055 (NRRL Y-10921) käyttämällä joko NTG- tai EMS-mutageneesiä, kuten esimerkeissä 1A ja 1B on kuvattu. Seuraava kulkukaavio kuvaa jokaisen mutanttikannan geneettisen historian. Vasemman puoleisessa palstassa olevat numerot ilmaisevat sukupolven. Kirjaimet EMS ja NTG edustavat tyyppiä tehdystä mutageneesistä, jolla saadaan seuraava listassa oleva sukupolvi. Jokaiseen sukupolveen käytetään malja- ja ravistelupulloseulontoja, samoin kuin astaksantiinin uuttoa asetonilla satojen jälkeläisten seulomiseksi ennen seuraavaa mutageneesikierroksen suorittamista.

Taulukko 3

Mutantin kehittämisen kulkukaavio



Esimerkki 2

A. Phaffia rhodozyman suuren solutiheyden fermentaatio

Tämä esimerkki osoittaa, että Phaffia rhodozymaa voidaan kasvattaa suuressa solutiheydessä jatkuvassa fermentaatio-

prosessissa käyttämällä Phillips Petroleum Company High Cell Density fermentaatioprosessia, joka on esitetty U.S. 4617274:ssä (ja liitetty tähän viitteeksi), Phaffia rhodozyma PC 8057 kasvatettiin seuraavissa olosuhteissa:

1. kasvatuslämpötila oli 22°C,
2. kasvatus-pH:n alue oli 4,5-5,0 käyttämällä ammoniakkia ja fosforihappoa pH-kontrolliin,
3. liuennut happi pidettiin suurempana kuin 75 % kyllästys lisätyllä ravistelulla, liittämällä ilmavirran, jossa oli happea ja/tai kohonneella fermentoriastian paineella,
4. kasvatusalusta koostui FM-21:stä, johon oli lisätty 0,05 mg/l biotiinia, 1 mg/l tiamiinia ja 0,1 % hiivauutetta,
5. kemostaatin laimennusnopeudet pidettiin 0,054-0,057 tilavuutta/h.

Fermentaation jälkeen kemostaatista ulos virtaavia nesteitä pidettiin 72 h huoneenlämpötilassa mutta ilman ilmastusta ja pH kontrolloitiin 4,5-5,0, jolloin annettiin solun astaksantiinisisällön nousta maksimitasoille. Tuloksista on yhteenveto taulukossa 4.

Taulukko 4

Päivä	% glukoosia sisäänsyötössä	Laimennus-kerroin	pH	T	%DO	RPM	Kuiva-solu g/l	Astaksantiini µg/l	Astaksantiini PPM
1	2		4.7	21.5	100	300	ND	ND	ND
2	2		4.7	21.5	100	300	ND	ND	ND
3	10	.053	4.8	21.5	68	300	26.7	13969	523
4	10	.059	4.7	21.6	71	300	23.7	12000	506
5	10	.026	4.7	21.5	59	300	ND	ND	ND
6	10	.043	4.7	21.4	45	300	36.6	18656	510
7	10	.037	4.7	21.5	65	300	37.4	21338	571
8	10	.037	4.7	21.6	100	300	37.5	23438	625
9	10	.077	4.7	21.7	59	300	38.7	19500	504
10	10	.050	4.7	21.6	51	300	39.2	20850	532
11	20	.037	4.6	21.9	30	700	ND	ND	ND
12	20	.037	4.6	21.8	18	700	ND	ND	ND
13	20	.030	4.6	21.8	88	700	75.9	38250	504
14	20	.042	4.7	22.0	100	1000	80.6	38438	477
15	20	.053	4.7	22.1	92	1000	76.3	45563	597
16	20	.048	4.6	22.0	100	1000	79.9	43350	543
17	20	.050	4.6	21.9	100	1000	82.5	42375	514
18	20	.067	4.7	21.6	92	1000	83.3	51150	614
19	20	.030	4.7	21.6	100	1000	76.4	34650	454
20	20	.077	4.6	21.7	0	1000	94.7	21375	226
21	30	.048	4.9	21.9	59	1000	107.2	59550	556
22	30	.043	4.7	21.7	100	1000	108.9	54563	501
23	30	.040	4.6	21.8	100	1000	103.9	62100	598

Taulukko 4 (jatkuu)

Päivä	% glukoosia sisään-syötössä	HR RT	pH	T	%DO	RPM	kuiva-solu g/l	Astaksantiini µ/l	Astaksantiini PPM
24	30	.037	4.8	21.6	100	1000	96.1	42450	442
25	30	.053	4.6	21.8	41	1000	107.1	62625	585
26	30	.043	4.6	21.8	35	1000	94.3	81188	861
27	30	.056	4.6	21.8	35	1000	99.0	54938	555
28	30	.048	4.6	22.0	39	1000	128.3	88875	693
29	30	.056	4.6	21.8	47	1000	119.7	66000	551
30	30	.053	4.6	22.0	39	1000	106.7	74250	696
31	30	.037	4.6	21.8	56	1000	104.5	76875	736

Taulukko 4 (jatkuu)

Ymppialusta = 100 ml YEPD
Fermentorin käynnistysalusta = 1M3 + 2 % glukoosi + 0,1 % hiivauute + biotiini 0,08 mg/l + tiamiini 1,00 mg/l
10 % syöttö = FM21 + 10 % glukoosi + 0,2 % hiivauute + biotiini 0,08 mg/l + tiamiini 1,00 mg/l
20 % syöttö = 2xFM21 + 20 % glukoosi + 0,4 % hiivauute + biotiini 0,08 mg/l + tiamiini 1,00 mg/l
0 % syöttö = 3xFM21 + 30 % glukoosi + 0,6 % hiivauute + biotiini 1,60 mg/l + tiamiini 2,00 mg/l
ND = ei määritetty (not determined)

B. Phaffia rhodozyman panos-syöttö kasvu 4 litran fermentorissa

Tästä esimerkistä saadaan protokolla, jota on käytetty kasvattamaan Phaffia rhodozyma-kantoja 4 l fermentoriastiassa panos-syöttö-prosessissa.

Ympättiin Phaffia rhodozyman tuore viljelmä 250 ml:n Erlenmeyer-pulloon, jossa oli 100 ml ravistelupulloalustaa (ravistelupulloalusta sisältää 0,6 % hiivauutetta, 0,6 % mallasuutetta ja 2,0 % glukoosia). Sitten pulloa inkuboitiin noin 20°C:ssa 72 h. Sisältö siirrettiin 2800 ml:n Fernbach-pulloon, jossa oli 1000 ml ravistelupulloalustaa ja inkuboitiin taas noin 20°C:ssa 24 h. Sisältö siirrettiin 4 l fermentoriin, jossa oli 1000 ml 2 x BioLafitte-alustaa (kaksinkertainen konsentraatio). Fermentorin alkutilavuus oli 2 l, pH = 5,2 ja 20°C.

4 päivän kasvatuksen aikana pH kontrolloitiin 5,2-5,5 (käyttämällä ammoniakkia ja fosforihappoa), lämpötila kontrolloitiin 19°C-21°C (käyttämällä jäähdyttävää vesihaudetta) ja liuennut happi (DO) pidettiin 30 %-80 % kyllästyksessä (lisäämällä ravistelua ja ilmavirtausta jos tarpeen).

Fermentaation annettiin mennä niin, että ylläpidettiin vähäistä positiivista glukoosia (0,1 %-0,3 %) ensimmäiset 50

h. Sen jälkeen, kun alkuperäinen glukoosi loppui fermentorissa, aloitettiin syöttää 50 % glukoosivarastosta (750 g glukoosia + 750 g H_2O, steriili). Alkusyöttönopeudet olivat yleensä hitaat, mutta nousivat sen jälkeen nopeasti. Glukoosikonsentraatiota kontrolloitiin HPLC:llä tämän prosessin aikana. Fermentaation annettiin sitten tapahtua glukoosilimitaatiolla (glukoosia ei havaittu). Fermentaatio oli täydellinen 24 h sen jälkeen, kun kaikki ravinto oli lisätty, edellyttäen että liemessä ei havaittu glukoosia. Vaahdon kontrolloimiseksi lisättiin 3-4 tippaa MAZU DF-37C:tä Mazur Chemicals, Gurnee, Ilinois, kohti litraa työskentelytilavuutta kuten tarvittiin.

C. Phaffia rhodozyman panos-syöttö kasvatus 20 l astiassa

Tästä esimerkistä saadaan protokolla, jota on käytetty kasvattamaan Phaffia rhodozyma-kantoja 20 l fermentoriastiassa panos-syöttö-prosessissa.

Ympättiin Phaffia rhodozyman tuore viljelmä 250 ml:n Erlenmeyer-pulloon, jossa oli 100 ml ravistelupulloalustaa (ravistelupulloalusta sisältää 0,6 % hiivauutetta, 0,6 % mallasuutetta ja 2,0 % glukoosia). Sitten pulloa inkuboitiin noin 20°C:ssa 72 h. Sisältö siirrettiin 2800 ml:n Fernbach-pulloon, jossa oli 1000 ml ravistelupulloalustaa ja inkuboitiin taas noin 20°C:ssa 24 h. Sisältö siirrettiin BioLafitte™-fermentoriin, jossa oli 9 l BioLafitte-alustaa. Fermentorin alkutilavuus oli 10 l, pH = 5,2 ja 20°C.

4 päivän kasvatuksen aikana pH kontrolloitiin 5,2-5,5 (käyttämällä ammoniakkia ja fosforihappoa), lämpötila kontrolloitiin 19°C-21°C (käyttämällä jäähdyttävää vesihaudetta) ja liuennut happi (DO) pidettiin 30 %-80 % kyllästyksessä (lisäämällä ravistelua ja ilmavirtausta jos tarpeen).

Fermentaation annettiin mennä niin, että ylläpidettiin

vähäistä positiivista glukoosia (0,1 %-0,3 %) ensimmäiset 50 h. Sen jälkeen, kun alkuperäinen glukoosi loppui fermentorissa, aloitettiin syöttää 50 % glukoosivarastosta (3750 g glukoosia + 3750 g H_2O, steriili). Alkusyöttönopeudet olivat yleensä hitaat, mutta nousivat sen jälkeen nopeasti. Glukoosikonsentraatiota kontrolloitiin HPLC:llä tämän prosessin aikana. Fermentaation annettiin sitten tapahtua glukoosilimitaatiolla (glukoosia ei havaittu). Fermentaatio oli täydellinen 24 h sen jälkeen, kun kaikki ravinto oli lisätty, edellyttäen että liemessä ei havaittu glukoosia. Vaahdon kontrolloimiseksi lisättiin 3-4 tippaa MAZU DF-37C:tä Mazur Chemicals, Gurnee, Ilinois, kohti litraa työskentelytilavuutta kuten tarvittiin.

D. Uudet kannat

Seuraavat taulukot osoittavat suuret tuottavuudet, jotka on tuotettu tämän keksinnön uusissa kannoissa.

Taulukko 5

	Astaksantiinia µg/g		
Mutantti	Malja[1]	Ravistelupullo[2]	Fermentori[3]
PC8059	877	726	1108
PC8065	559	720	900
PC8088	1622	1462	ND
PC8091	1988	3531	3300
PC8093	1811	3570	1121
PC8071	977	1792	ND
PC8075	1681	2179	2155
PC8077	1345	2602	2009

[1] Maljat kasvatettiin ja määritettiin, kuten esimerkissä 1.C.1. on kuvattu.

[2] Ravistelupulloviljelmät kasvatettiin rikkaalla kasvumääritysalustalla 250 ml:n Erlenmeyer-pullossa silmukallisesta Phaffia rhodozyma-viljelmää (joka oli otettu 7 päivää vanhoilta maljaviljelmiltä). Ympättyä 250 ml:n pulloa inkuboitiin 20-22°C:ssa voimakkaasti ravistellen. Kantoja kasvatettiin 5 päivää (120 h), sitten kerättiin ja määritettiin.

[3] Fermentoriviljelmiä kasvatettiin, kuten esimerkissä 2, B tai C on kuvattu.

Taulukko 6

Mutantti	Astaksantiinia µg/l/h Ravistelupullo[1]	Fermentori[2]
PC8059	78,9	405
PC8065	55,9	480
PC8088	80,7	ND
PC8091	51,5	961
PC8093	55,0	401
PC8071	57,5	ND
PC8075	97,7	415
PC8077	47,0	269

[1] Ravistelupulloviljelmiä kasvatettiin kuten taulukossa 5 kuvattiin.

[2] Fermentoriviljelmiä kasvatettiin, kuten esimerkissä 2, B tai C on kuvattu.

Esimerkki 3

A. Phaffia rhodozyman entsymaattinen lyysays

Tämä esimerkki osoittaa, että pilkkova entsyymivalmiste Trichoderma harzianumista on hyvin tehokas vapauttamaan Phaffia rhodozyma-solujen sisältämän astaksantiinin.

Seuraavia entsyymejä käytettiin lyysaamaan Phaffia rhodozyma-solut kannasta PC 8059 (NRRL Y-18549) astaksantiinin vapauttamiseksi. Kaikki testattiin 30°C:ssa ja valmistajan suosittelemassa pH:ssa. Tulosten yhteenveto on taulukossa 7. Solukonsentraatio ennen lyysaysta oli noin 68 g/l.

Tässä esimerkissä käytetyt Phaffia rhodozyma-solut kasvatettiin kuten esimerkissä 2.C.2 kuvattiin. Vapautuneen astaksantiinin prosenttiosuus määritettiin fotometrisesti mittaamalla absorptio (478 nm) jokaisesta näytteestä jokaisen entsyymikäsittelyn jälkeen ja jakamalla tuo arvo absorptioarvolla, joka saatiin samalla lailla kasvatettujen Phaffia rhodozyma-solujen asetoniuutolla. Sekä entsyymikäsittelyssä että asetoniuutossa käytettiin samat määrät soluja. Asetoniuutto tehtiin kuten esimerkissä 1.C.2.b on

kuvattu.

Taulukko 7

Entsyymi	Annos	Aika	Vapautunut astaksantiini*
Novo Mutanase SP299[1] (jauhe)	0,1 g/l	24 h	79 %
		48 h	92 %
	0,12 g/l	22 h	81 %
		43 h	95 %
	0,5 g/l	24 h	99 %
	1 g/l	24 h	99 %
	1 g/l	24 h	97 %
Genencor Cytolase 123[2] (neste)	10 ml/l	27 h	38 %
		48 h	60 %
		120 h	62 %
	10 ml/l	48 h	29 %
	50 ml/l	48 h	55 %
Novo Visco-zyme 120L[3] (neste)	10 ml/l	24 h	22 %
		48 h	28 %
Novo Gamanase 1.5L[4] (neste)	10 ml/l	24 h	5 %
Novo Geremix 2XL[5] (neste)	10 ml/l	24 h	8 %

* Kuten esimerkissä 1.C.2 on määritetty.

[1] Novo Laboratories, Danbury, CT, valmistaa Mutanasea.

[2] Genencor, South San Francisco, CA, valmistaa Cytolase 123:a.

[3] Novo Laboratories, Danbury, CT, valmistaa Viscozymea.

[4] Novo Laboratories, Danbury, CT, valmistaa Gamanasea.

[5] Novo Laboratories, Danbury, CT, valmistaa Ceremixiä.

Tulokset osoittavat, että Mutanase™, pilkkova entsyymivalmiste Trichoderma harzianumista, on erityisen tehokas lyysaamaan Phaffia-soluja verrattuna muihin testattuihin entsyymivalmisteisiin.

B. Phaffia rhodozyman mekaaninen rikkominen

Phaffia rhodozyma PC 8057-näytteet, jotka valmistettiin esimerkissä 2 A päivänä 31, altistettiin mekaaniselle rikkomiselle käyttämällä helmijauhamista, Gaulin puristinta ja Microfluidics mikrojuoksutetta. Tuloksista on yhteenveto taulukossa B.

Taulukko 8

Phaffia rhodozyma-kannan mekaaninen rikkominen ?

	Uutettavan astaksantiinin prosentti[1]		
Läpäisy	Helmijauhatus[2]	Gaulin puristin[3]	Microfluidics[4]
0	12	7	15
1	32	75	73
2	37	92	93
3	40	99	101
4	42	98	102
5		99	101
Kontrolli[1]	100	100	100

[1]perustuu asetonilla uutettavaan astaksantiiniin soluista, joita on rikottu 6 min helmisurvimessa (7,875 pg astaksantiinia/ml solususpensio).

[2]Willy A. Bachofen Machinenfabrik, Basel, Sveitsi, Dyno-Mill, valmistanut.

[3]Saatu Gaulin yhtiöltä, Everett, Ma., malli 65 M3 10TBSX.

Solun homogenisaattori malli 110T toimi 4 l/min virtausnopeudella, jossa oli 20 l säiliö 9500 psi, saatu Microfluidic yhtiöltä, Newton, Ma.

Esimerkki 4

Tämä esimerkki osoittaa, että Phaffia rhodozymasta saadun astaksantiinin käyttö on tehokas ravintopigmenttilisä lohen sukuisille. Tämä esimerkki osoittaa myös, että Phaffia rhodozyma-solujen tehokas valmistaminen on tarpeellista

ennenkuin Phaffia rhodozyma-soluissa oleva astaksantiini on saatavilla lohen sukuisille ravintopigmenttinä.

A. Phaffia rhodozyman kasvatus

Tässä esimerkissä käytetty Phaffia rhodozyma oli PC 8059. Silmukallinen jokaista PC 8059-viljelmää siirrostettiin 7 päivää vanhalta maljalta 4 erilliseen 250 ml:n Erlenmeyer-pulloon, joissa oli 100 ml modifioitua YM-lientä (ilman agaria). 250 ml Erlenmeyer-pulloja inkuboitiin soikealla ravistelijalla (250 rpm) 48 h 22°C:ssa. Otettiin jokaisesta pullosta erikseen 50 ml ja siirrostettiin 4:ään 2,8 l:n Fernbach-pulloon, joissa oli 1 l modifioitua YM-lientä (ilman agaria). Fernbach-pulloja inkuboitiin pyörivällä ravistelijalla (250 rpm) 56 h 22°C:ssa.

4 l ympit Fernbach:sta siirrostettiin 400 l fermentoriin, jossa oli 156 l FM-21 suoloja, joka sisälsi 2 % Amberex™ 1003:a (katso taulukko 2). 400 l fermentorissa oli näyttölaite ja kontrolli pH:lle, liuenneelle hapelle, sekoittamisnopeudelle, lämpötilalle, ilmanvirtaukselle, paineelle, vaahdolle ja painolle. Fermentorin pH säädettiin 4,8:ksi ammoniakilla. Ravintolisäys aloitettiin 0,6 l/h:ssa ja glukoosikonsentraatiota tarkkailtiin HPLC:llä. Syöttönopeutta lisättiin tasaisesti ymppäämisen jälkeen 2,7-2,8 l/h maksiminopeuteen, kun syöttö oli täydellinen. Kasvatuksen aikana lisättiin yhteensä 125 l ravintoa. Syötön aikana fermentori pidettiin 22°C:ssa ja pH kontrolloitiin 4,8-5,5. Liuenneen hapen sisältö ylläpidettiin 30 %-60 % kyllästyksessä. Sen jälkeen, kun ravinto oli käytetty, pidettiin fermentori 24 h 22°C:n lämpötilassa ja pH:n annettiin nousta 6,4:ään. Liuenneen hapen sisältöä koko jakson ajan kontrolloitiin niin, että se oli alle 90 %:a vähentämällä ilmanvirtausta ja sekoitusnopeutta.

Ensimmäinen 400 l fermentoriajo päätyi 275 l kokonaistilavuuteen. 150 l tästä toiminnasta homogenisoitiin ja suih-

kukuivattiin. Jäljellejääneet 125 l suihkukuivattiin ilman homogenisaatiota käytettäväksi kokosoluina. Tehtiin toinen 400 l fermentori, kuten edellä kuvattiin, ja päädyttiin 200 lopulliseen tilavuuteen. 200 l tästä toiminnasta rikottiin entsymaattisesti ja suihkukuivattiin.

Suihkukuivaus tehtiin 125 ja 150 l annoksille fermentaatioliemestä. Lisättiin 400 ppm antioksidantti etoksikiiniä, 1000 ppm Rangen C-vitamiini polyfosfaattia ja 1000 ppm askorbutyylipalmitaattia jokaiseen fermentoriliemen annokseen. Sitten liemi pastöroitiin 75°C-86°C:ssa. Pastöroitu fermentaatioliemi kuivattiin sitten pöytäsuihkukuivurilla sisään tulevan lämpötilan ollessa 280°C-284°C ja ulosmenevä 80°C-96°C.

Phaffia-solujen homogenisaatio fermentaatioliemestä tehtiin 150 l liemiannoksilla, joita oli pidetty 300 l tankissa 10°C:ssa. Homogenisaatio suoritettiin Gaulin homogenisaattorilla 8000 psig - 10000 psig kierrätystavalla 4 l/yksikkö virtausnopeudella yhteensä 4 h (vastaa 6,4 läpikulkua homogenisaattorin läpi).

Phaffia rhodozyman entsymaattinen pilkkominen tehtiin käyttämällä 26 g Novo Mutanase™ SP299:ää (Novo Laboratories, Danbury, Conneticut). 26 g Novo Mutanase™ SP299:ää liuotettiin 200 ml:aan deionisoitua vettä ja steriilisuodatettiin ennen fermentaatioliemeen lisäystä. Liuotettu Mutanase™ lisättiin sitten 220 l:aan lientä 400 l fermentorissa. Sitten lientä inkuboitiin varovasti sekoittaen (100 rpm sekoitus) typpikerroksen alla 30°C:ssa 22 h. Jokaisen näiden näytteiden astaksantiinisisältö määritettiin HPLC:llä, kuten esimerkissä 2 kuvattiin. Purolohirehu, jota käytettiin seuraavissa rehututkimuksissa, formuloitiin tarkoituksena saada yhtäläiset konsentraatiot kokonaisastaksantiinia purolohirehuun.

B. Purolohen syöttötutkimukset - syöttö- ja aikavertailut

Alla oleva taulukko 9 kuvaa tulokset purolohen syöttötutkimuksista, joissa käytettiin Carophyll Pink:ä, negatiivinen kontrolli, mekaanisesti rikottuja soluja, kokosoluja ja entsymaattisesti rikottuja Phaffia rhodozyma-soluja. Tämä taulukko osoittaa, että mekaanisesti rikotuista Phaffia rhodozyma-soluista tai entsymaattisesti rikotuista Phaffia rhodozyma-soluista saadaan olennaisesti kaikki Phaffia rhodozyma-soluissa läsnäoleva astaksantiini saataville. Taulukko 9 osoittaa, että rikkomattomista Phaffia rhodozyma-soluista ei saada merkittäviä määriä astaksantiinia ravintopigmenttilisäksi. Kuten taulukossa 9 osoitetaan, astaksantiinin uutettavuus, joka on määritetty asetoniuutolla, korreloi hyvin lohen sukuisten käyttämällä astaksantiinilla, jota on Phaffia rhodozyma-soluissa. Tämän tutkimuksen yksityiskohdat on esitetty alla.

Taulukko 9

Ravinto	Purolohen astaksantiinisisältö 30 päivää[a]	60 päivää[b]	90 päivää[b]
Ravinto 1 Purolohen liha (ppm)	5,01 ± 1,89	5,62 ± 1,58	6,65 ± 3,31
Rehu (ppm)	72,2	53,3	53,3
Ravinto 2 Purolohen liha (ppm)	0	0	0
Rehu (ppm)	0	0	0
Ravinto 3 Purolohen liha (ppm)	1,57 ± 0,92	2,89 ± 0,80	5,47 ± 2,05
Rehu (ppm)	30,8	31,8	31,8
Ravinto 4 Purolohen liha (ppm)	0,59 ± 0,34	0,90 ± 0,47	1,68 ± 0,93
Rehu (ppm)	9,6	8,8	8,8
Ravinto 5 Purolohen liha (ppm)	1,89 ± 0,93	2,48 ± 1,41	5,38 ± 1,67
Rehu (ppm)	32,7	35,0	35,0

Ravinto 1: Carophyll Pink
Ravinto 2: Negatiivinen kontrolli
Ravinto 3: Mekaanisesti rikottu Phaffia
Ravinto 4: Kokosolu Phaffia
Huomautus: (Ravinto 4, rehu (ppm) astaksantiinia saatavilla kuten asetoniuutolla määritetty. Kokonais-astaksantiini on noin 31 ppm jokaiselle jaksolle).
Ravinto 5: Entsymaattisesti rikottu Phaffia
[a]Ravinto taulukossa 10
[b]Ravinto taulukossa 11

Purolohen rehututkimuksia tehtiin 90 päivää, kuten edellä on pääpiirteiittäin esitetty. Purolohen ravinto 30 päivänä on kuvattu taulukossa 10. Tämä ravinto muotoiltiin uudelleen 60 päivänä taulukossa 11 kuvatuksi ravinnoksi, ja mitä käytettiin rehututkimuksen jäljelle jäävä aika. Tuotetta A (osoitettu taulukoissa 10 ja 11) käytettiin ravinnossa 3 ja se sisälsi mekaanisesti rikottuja Phaffia rhodozyma-soluja (kanta PC8059), ravinto 3 sisälsi 30-32 ppm saatavilla ole-

vaa astaksantiinia. Tuotetta B (osoitettu taulukoissa 10 ja 11) käytettiin ravinnossa 4 ja siinä oli kokonaisia Phaffia rhodozyma-soluja (kanta PC8059), ravinto 4 sisälsi 29 ppm astaksantiinia kokonais-astaksantiinia. Tuote C (osoitettu taulukoissa 10 ja 11) käytettiin ravinnossa 5 ja siinä oli entsymaattisesti rikottuja (käyttämällä Mutanase™) Phaffia rhodozyma-soluja (kanta PC8059), ravinto 5 sisälsi 30 ppm astaksantiinia. Kaikki Phaffia rhodozyma-solut kasvatettiin 400 l fermentorissä kuten esimerkissä 2 kuvattiin.

Taulukko 10

Testirehujen 1-5 ainesosat, jotka syötettiin sateenkaariraudulle Phaffia rhodozyman hiivaruokintakokeissa

Ainesosa	Ravinto 1 1 %	Ravinto 2 1 %	Ravinto 3-5 1 %
Sillijauho	39,00	39,00	39,00
Soijapapujauho	14,00	14,00	9,00
[1]Tuotteet A, B tai C	0,00	0,00	5,00
Puuvillansiemenjauho	10,00	10,00	10,00
Verijauho	5,00	5,00	5,00
Panimohiiva	5,00	5,00	5,00
Vehnäjauhot (wheat clears)	8,55	8,55	8,55
Kuivattu hera	5,00	5,00	5,00
[2]Permapel	2,00	2,00	2,00
Kalaöljy	9,60	9,60	9,60
[3]Vitamiiniseos	0,40	0,40	0,40
[4]Mineraaliseos	0,10	0,10	0,10
Koliinikloridi (70 %)	0,10	0,10	0,10
[5]Stay-C	0,11	0,11	0,11
Gelatiini	1,40	1,14	1,14
[6]CP	0,10	0,00	0,00
Yhteensä	100,00	100,00	100,00

[1]Suihkukuivattu Phaffia rhodozyma
[2]Binder
[3]US F&WS nr. 30, katso alusta-, puskuri- ja liuosluettelo esimerkkien alussa.
[4]US F&WS nr. 30, katso alusta-, puskuri- ja liuosluettelo esimerkkien alussa.
[5]L-askorbyyli-2-polyfosfaatti (100 ppm askorbiinihappoekvivalentti, w/w)
[6]Carophyll Pink 5 % astaksantiini (minimi) gelatiinikantajassa (Hoffman La-Roche)

Taulukko 11

Testirehujen 1-5 ainesosat, jotka syötettiin sateenkaariraudulle Phaffia rhodozyman hiivaruokintakokeissa

Ainesosa	Ravinto 1 1 %	Ravinto 2 1 %	Ravinto 3-5 1 %
Sardellijauho	30,00	30,00	30,00
Soijapapujauho	14,00	14,00	9,00
[1]Tuotteet A, B tai C	0,00	0,00	5,00
Puuvillansiemenjauho	10,00	10,00	10,00
Verijauho	5,00	5,00	5,00
Panimohiiva	5,00	5,00	5,00
Vehnäjauhot (wheat clears)	17,55	17,55	17,55
Kuivattu hera	5,00	5,00	5,00
[2]Permapel	2,00	2,00	2,00
Kalaöljy	9,60	9,60	9,60
[3]Vitamiiniseos	0,40	0,40	0,40
[4]Mineraaliseos	0,10	0,10	0,10
koliinikloridi (70 %)	0,10	0,10	0,10
[5]Stay-C	0,11	0,11	0,11
Gelatiini	1,10	1,10	1,10
[6]CP	0,08	0,00	0,00
Yhteensä	100,00	100,00	100,00

[1]Suihkukuivattu Phaffia rhodozyma
[2]Binder
[3]US F&WS nr. 30, katso alusta-, puskuri- ja liuosluettelo esimerkkien alussa.
[4]US F&WS nr. 30, katso alusta-, puskuri- ja liuosluettelo esimerkkien alussa.
[5]L-askorbyyli-2-polyfosfaatti (100 ppm askorbiinihappoekvivalentti, w/w)
[6]Carophyll Pink 5 % astaksantiini (minimi) gelatiinikantajassa (Hoffman La-Roche)

C. Pigmentin uutto purotaimenen valmissekoitteesta ja ravintoannoksista

2 g kutakin 5 rehun valmissekoitetta punnittiin kaksoiskappaleina ja asetettiin 40 ml polypropyleenisentrifuugiputkiin. Noin 5 g kutakin 5 purotaimenen ravintoannoksen pelletttiä jauhettiin hienoksi jauheeksi huhmareessa ja survimessa. 2 g kutakin 5 rehun valmissekoitetta punnittiin kaksoiskappaleina ja asetettiin 40 ml polypropyleenisentrifuugiputkiin.

Lisättiin 10 ml deionisoitua vettä jokaiseen valmissekoitteen ja purotaimenen ravintoannoksen näytteiden putkeen. Putkia inkuboitiin 55°C:ssa 10 min sekoittaen silloin tällöin ja annettiin jäähtyä huoneenlämpötilaan. Lisättiin 20 ml asetonia jokaiseen sentrifuugiputkeen ja sekoitettiin vortexilla 30 sek. Kiinteät pelletoitiin sentrifugoimalla 12000 x g 5 min 22°C:ssa. Supernatantti dekantoitiin ja pidettiin jokaisesta putkesta.

Sitten lisättiin 20 ml asetonia supernatanttiin ja sekoitettiin vortexilla 30 sek. Kiinteät pelletoitiin taas sentrifugoimalla 12000 x g 5 min 22°C:ssa. Supernatantit dekantoitiin ja jäähdytettiin jokaista uuttoa varten.

Lisättiin 10 ml metyleenikloridia (CH_2Cl_2) jokaiseen näytteeseen (20 ml lisättiin näytteisiin, joissa oli Carophyll Pinkiä) ja sekoitettiin vortexilla. Annettiin faasien erottua. Alempi faasi, jossa pigmentti oli, poistettiin ja säilytettiin. Suoritettiin toinen CH_2Cl_2-uutto ja pigmenttiä sisältävät fraktiot jäähdytettiin. Liuotin poistettiin jokaisesta näytteestä kuivaamalla panemalla alttiiksi typpipyyhkäisylle vähennetyssä valossa (vetokaapissa) huoneenlämpötilassa.

Jokainen näyte liuotettiin 10,0 ml:aan n-heksaania ja lisättiin 1 g vedetöntä Na_2SO_4:a kaiken veden poistamiseksi. Sitten laitettiin 1,0 ml jokaista näytettä Florisil Cartridge Sep Pak:iin (vesi lipidien poistamiseksi näytteestä). Tämä pestiin 10 ml:lla n-heksaania ja sen jälkeen 10 ml:lla 70:30 n-heksaani:dietyylieetteri. Kaikki pigmentti, joka oli tarttunut pylvääseen, huuhdeltiin 10 ml:lla asetonia ja säilytettiin. Kaikki jäljelle jäänyt asetoni poistettiin näytteestä taas kuivaamalla panemalla alttiiksi typpipyyhkäisylle vähennetyssä valossa (vetokaapissa) huoneenlämpötilassa. Jokainen näyte liuotettiin 1,0 ml:aan metanolia ja kokonaisastaksantiini määritettiin kuten esimerkissä 1.C.2.

D. Pigmentin uutto sateenkaarirouskun lihasta

Noin 10 g sateenkaarirouskun lihaa hienonnettiin partakoneenterällä (tarkka paino laitettiin ylös). Lisättiin 20 ml asetonia ja näyte jauhettiin huhmareessa ja survimessa. Asetoniuute dekantoitiin kertakäyttöiseen muoviseen sentrifuugiputkeen ja lisättiin taas 10 ml asetonia näytteeseen. Näyte jauhettiin taas ja näyte ja asetoni siirrettiin samaan sentrifuugiputkeen. Näytettä sentrifugoitiin 2000 rpm 10 min 20°C:ssa. Supernatantti dekantoitiin 11 drakman lasiampulliin ja kuivattiin N_2-virrassa. Lisättiin taas 10 ml asetonia muovisiin sentrifuugiputkiin, sekoitettiin vortexilla ja sentrifugoitiin 2000 rpm 10 min 20°C:ssa. Supernatantti dekantoitiin taas 11 drakman lasiampulliin. (Tässä vaiheessa, jos pelletti ei ollut väritön pitäisi uutto toistaa). Näyte kuivattiin taas N_2-virrassa kunnes vain vesifaasi oli jäljellä.

Lisättiin 1 ml dietyylieetteriä ja 5 ml n-heksaania uutteeseen ja sekoitettiin vorteksilla voimakkaasti. Annettiin faasien erottua ja ylempi orgaaninen faasi (jossa oli pigmentti) poistettiin lasiampulliin Pasteur-pipetillä ja kuivattiin N_2-virrassa.

Näyte uutettiin taas 5 ml:lla n-heksaania, faasien annettiin erottua ja ylempi orgaaninen faasi poistettiin taas. Tämä uuttomenetelmä toistettiin, kunnes ylempi orgaaninen faasi oli väritön. Näytteet kerättiin ja kuivattiin N_2-virrassa. Pigmentti liuotettiin 10 ml:aan n-heksaania ja 1-2 g vedetöntä Na_2SO_4:ää lisättiin kaiken veden poistamiseksi.

3,0 ml jokaista uuttoa laitettiin Silica Cartridge Sep Pak:iin. Tämä pestiin 10 ml:lla n-heksaania ja sen jälkeen 5 ml:lla 70:30 n-heksaani:dietyylieetteriä. Kaikki pigmentti, joka oli tarttunut pylvääseen, huuhdeltiin 10

ml:lla asetonia ja säilytettiin. Asetoni poistettiin jokaisesta näytteestä taas kuivaamalla N_2-virrassa. Jokainen näyte liuotettiin 3,0 ml:aan metanolia ja astaksantiinikonsentraatiot määritettiin kuten esimerkissä 1.C.2.

Patenttivaatimukset

1. Phaffia rhodozyma-kanta, joka tuottaa 45-100 µg/l/h, edullisesti 55-100 µg/l/h ja edullisimmin 78-100 µg/l/h rajoissa astaksantiinia kuivapainopohjalta, kun kasvatetaan ravistelupullossa.

2. Phaffia rhodozyma-kanta, joka tuottaa 400-962 µg/l/h, edullisesti 480-962 µg/l/h rajoissa astaksantiinia kuivapainopohjalta, kun kasvatetaan panos-syöttö-fermentaatioastiassa.

3. Phaffia rhodozyma-kanta tallennettu NRRL Y-18549, NRRL Y-18550, NRRL Y-18554, NRRL Y-18555, NRRL Y-18556, NRRL Y-18551, NRRL Y-18552 ja NRRL Y-18553.

4. Menetelmä kasvattaa Phaffia rhodozyma-soluja, jotka tuottavat suuret astaksantiinisaannot, koostuu:

(a) saatetaan Phaffia rhodozyma-solut kosketuksiin ravintoalustan kanssa, jossa on typpi- ja fosforilähteet, mineraaleja ja hivenaineita fermentaatioliemen muodostamiseksi;

(b) ylläpidetään mainitun fermentaatioliemen pH:ta 3,3-5,5, lämpötilaa 18-22°C:een rajoissa ja liuenneen hapen sisältöä 10-80 % kyllästyksessä ja

(c) saatetaan fermentaatioliemi kosketuksiin kasvatuksen aikana ainakin yhden hiilienergialähteen kanssa ja ylläpidetään mitattava ylimäärä mainittua hiilienergialähdettä 1-20 g/l rajoissa mainitussa fermentaatioliemessä, t u n n e t t u siitä, että mainittua hiilienergianlähdettä annetaan sellaisena määränä, joka ei johda kasvua inhiboivan alkoholi- tai aldehydimäärän tuottoon.

5. Patenttivaatimuksen 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu hiilienergianlähde valitaan sukkinaatista, fumaraatista, malaatista, puryvaatista, glukoo-

sista, sakkaroosista, fruktoosista, maltoosista, maissisiirapista, hydrolysoidusta tärkkelyksestä ja niiden kahden tai useamman yhdistelmästä.

6. Patenttivaatimuksen 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että hiilienergianlähde valitaan sukkinaatista, glukoosista ja niiden yhdistelmistä.

7. Menetelmä, josta saadaan Phaffia rhodozyma-soluja, joissa on astaksantiinia sellaisessa muodossa, missä astaksantiini on lohen sukuisten, äyriäisten ja lintujen saatavilla astaksantiiniravintolähteenä mainitun menetelmän sisältäessä Phaffia rhodozyma-solujen, joissa on astaksantiinia, kosketuksiin saattamisen Trichoderma harzianum-homeen pilkkovan entsyymivalmisteen kanssa, joka kykenee ainakin osittain pilkkomaan Phaffia rhodozyman soluseinän.

8. Patenttivaatimuksen 7 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittua pilkkovaa entsyymivalmistetta käytetään 0,2-10,0 yksikön määränä kohti 100 g/l.

9. Patenttivaatimusten 7 ja 8 mukainen menetelmä suoritetaan 0-60°C:een lämpötilassa, edullisesti 20-30°C ja pH rajoittuen 4,0-5,5, edullisesti 4,5-5.