

(12) **PATENTSKRIFT**Patent- og
Varemærkestyrelsen

Ændret efter administrativ omprøvning

(51) Int.Cl⁷: **C 12 N 1/16 A 23 K 1/18 A 23 L 1/27 C 12 P 23/00**(21) Patentansøgning nr: **PA 1989 05133**(22) Indleveringsdag: **1989-10-16**(24) Løbedag: **1988-04-15**(41) Alm. tilgængelig: **1989-10-16**(45) Patentets meddelelse bkg. den: **1994-04-18**(45) Patentets ændring bkg. den: **2005-05-30**(86) International ansøgning nr: **PCT/DK88/00068**(86) International indleveringsdag: **1988-04-15**(85) Videreførelsesdag: **1989-10-16**(30) Prioritet: **1987-04-15 DK 1998/87**(73) Patenthaver: **DSM N.V., Het Overloon 1, 6411 LP Heerlen, Holland**(72) Opfinder: **Bent Flenø, Floravej 7, 3660 Stenløse, Danmark**
Ib Christensen, Ligustervangen 7, 3450 Allerød, Danmark
Robert Larsen, Hasselvej 32, 2830 Virum, Danmark
Steffen Radich Johnsen, Bredkær Tværvej 42, 8250 Egå, Danmark
Eric A. Johanson, 3901 Council Crest, Madison, WI 53711, USA(74) Fuldmægtig: **Plougmann & Vingtoft A/S, Sundkrogsgade 9, 2100 København Ø, Danmark**(54) Benævnelse: **Astaxanthin-producerende *Phaffia rhodozyma* gærceller, fremgangsmåde til deres fremstilling og deres anvendelse**

(57) Sammendrag:

Gærcelle, fortrinsvis en mutant af *Phaffia rhodozyma*, der, når den dyrkes under betingelser, der omfatter en oxygenoverførselshastighed på mindst 30 mmol pr. l pr. time på Difco YM-medium ved 20-22°C i 5 dage i 500 ml rystekolber med to prelleplader, der indeholder 50 ml af mediet, og underkastes omrystning ved cirkelbevægelse ved 150 omdr. pr. minut, idet inokulum er 100 µl af en 4 dage gammel YM-kultur, fremstiller det røde pigment, astaxanthin, i en mængde på mindst 300 µg pr. g gærtørstof, typisk mindst 800 µg pr. g gærtørstof, som bestemt ved HPLC-analyse under anvendelse af ren astaxanthin som standard af en methanolekstrakt af gæren, der er fremstillet ved at underkaste en suspension af 0,2 g gærtørstof i 20 ml methanol 5 x 1 minuts disintegration med intervaller på et halvt minut, idet disintegrationen udføres ved en temperatur på højst 20°C i en glaskuglemølle, der indeholder 15 g glaskugler med en diameter på 0,4 mm, idet glaskuglemøllen er forsynet med en kølekappe med isvand.

fortsættes

Astaxanthinmængden, der produceres af gærcellen, dvs. mindst 300 og typisk mindst 800 μg pr. g gærtørstof, bør sammenlignes med de mængder astaxanthin, der opnås af kendte *Phaffia rhodozyma* stammer, som er højst 250 μg pr. g gærtørstof. *Phaffia rhodozyma* mutanterne kan opnås ved konventionelle mutageniseringsmetoder. Gærcellerne dyrkes fortrinsvis ved fed-batch fermentering, som udføres under tilstrækkelig beluftning, idet fed-batch fermenteringen fortrinsvis omfatter en vækstfase og en efterfølgende vækstbegrænset fase. Efter dyrkningen kan gærcellerne for eksempel ødelægges og homogeniseres, og astaxanthinet kan eventuelt ekstraheres fra gærcellerne. Gærcellerne eller det ekstraherede astaxanthin kan anvendes i dyrefoder, især foder til anadrome fisk såsom laks eller ørred, der, når de fodres med det astaxanthinholige foder, opnår en attraktiv, rød farve.

Den foreliggende opfindelse angår astaxanthinproducerende *Phaffia rhodozyma*-gærstammer, en fremgangsmåde til fremstilling af astaxanthinproducerende *Phaffia rhodozyma*-celler eller celledele eller astaxanthin. Derudover angår opfindelsen et dyrefoder, som indeholder astaxanthinholdige gærceller eller

5 gærcelledele indeholdende astaxanthin, der er isoleret derfra, såvel som en fremgangsmåde til fodring af dyr med foderet.

Det er kendt, at den røde farve af kødet af anadrome fisk såsom laks eller havørred skyldes røde pigmenter såsom astaxanthin, som er til stede i den føde,

10 der indtages af fisken. I naturlige omgivelser opnår fiskene deres røde farve fra skaldyr eller andre astaxanthinholdige organismer, men når de dyrkes i fiskeopdræt har fiskene ikke adgang til disse naturlige pigmentkilder og opnår derfor ikke den attraktive røde farve, medmindre røde pigmenter tilføres med foderet.

15

Astaxanthin, der er isoleret fra skaldyrssaffald eller fremstillet syntetisk, såvel som andre syntetiske røde pigmenter såsom cantaxanthin er således blevet anvendt som bestanddele i fiskefoder. Anvendelsen af cantaxanthin i animalsk foder er imidlertid forbudt i visse lande, og den syntetiske astaxanthinproduktion såvel som

20 fremgangsmåden til isolering af naturligt astaxanthin er ganske dyr og ofte også genstand for sæsonmæssige variationer.

Der kendes andre naturlige astaxanthinkilder, herunder gæren *Phaffia rhodozyma* og visse mikroalger såsom den encellede gruppe af grønne alger *Chlamydomonas*

25 *nivalis* [Gert Knutson et al., "Pigmentering af laks med astaxanthin fra mikroalger", Norsk Fiskeopdræt nr. 3, pp. 4-6, 55 (1989)]. Det astaxanthin, der fremstilles af disse organismer, har vist sig at videregive den ønskede røde farve til anadrome fisk [Eric A. Johnson et al., "*Phaffia rhodozyma* as an astaxanthin source in salmonid diets", Aquaculture, 20, pp. 123-134 (1980) og JP-A 57-206342].

30 Anvendelsen af gærceller i store mængder som næring for fiskene er imidlertid ikke ønskværdig, idet dette foder ikke er tilstrækkeligt varieret. På den anden side er den mængde astaxanthin, der fremstilles af organismene, og som er til stede i en ernæringsmæssig acceptabel mængde gærceller, ikke tilstrækkelig til at opnå den ønskede farvning, og isoleringen af astaxanthin fra gær ved kendte metoder er

35 ganske dyr.

I Journal of General Microbiology, vol. 115 (1979), s. 173-183 (Johnson et al.) er det ganske vist angivet, at *Phaffia rhodozyma* kan producere 652 µg astaxanthin pr. g gær. Denne værdi er imidlertid baseret på totalt indhold af carotenoid og på
5 en analysemetode, der i forhold til metoden anvendt i det følgende resulterer i for høje værdier. Anvendes analysemetoden som beskrevet nedenfor, svarer 652 µg reelt til ca. 432 µg/g gær. I Journal of Bacteriology, vol. 59 (1985), s. 243-255 henvises til, at der i ovennævnte artikel er omtalt *Phaffia rhodozyma* med et astaxanthinindhold på 800-900 µg/g gær. Det nævnte indhold angår imidlertid
10 carotenoidindhold og korrigeret som ovenfor, er det højeste angivne astaxanthinindhold 540 µg/g gær.

Hvis det imidlertid vil være muligt at opnå en højere astaxanthinproduktion fra disse organismer, ville det være muligt at opnå en lønsom astaxanthinproduktion,
15 der ikke er underkastet sæsonmæssige betingelser.

Den foreliggende opfindelse tilvejebringer hidtil ukendte *Phaffia rhodozyma*-gærceller, som indeholder astaxanthin i tilstrækkeligt høje koncentrationer til at muliggøre anvendelsen af gærcellerne som eller i foder til anadrome fisk og
20 andre dyr, i hvilke en farvning af dyrets kød eller et produkt fra dyret er ønskværdigt. Opfindelsen tilvejebringer også en attraktiv fremgangsmåde til opnåelse af astaxanthin fra astaxanthinholdige gærceller, særligt de ovennævnte gærceller, der har et højt astaxanthinindhold. Vigtige aspekter af opfindelsen er baseret på en særlig metode til dyrkning af astaxanthinproducerende celler og/eller
25 tilvejebringelse af muterede stammer, der har en forbedret nedarvet evne til at fremstille astaxanthin.

Et aspekt af den foreliggende opfindelse angår således en *Phaffia rhodozyma*-gærcelle, som er den gærstamme, der er deponeret under deponeringsnr. 225-87
30 CBS, eller den gærstamme, der er deponeret under deponeringsnr. 215-88 CBS, eller en mutant eller et derivat deraf, eller en mutant eller et derivat af den gærstamme, der er deponeret under deponeringsnr. 225-87 CBS, hvilken gærcelle har bibeholdt den astaxanthinproducerende evne, og som, når den dyrkes under betingelser, der omfatter en oxygenoverførselshastighed på mindst 30 mmol pr.
35 liter pr. time på Difco YM medium ved 20-22°C i 5 dage i 500 ml rystekolber med 2

prelleplader, hvilke kolber indeholder 50 ml af mediet og er underkastet orbital omrystning ved 150 rpm, idet inokulum er 100 µl af en 4 dage gammel kultur i YM-medium, producerer astaxanthin i en mængde på mindst 600 µg pr. g gærtørstof bestemt ved HPLC-analyse under anvendelse af rent astaxanthin som standard på en methanolekstrakt af gæren, der fremstilles ved at underkaste en suspension af 0,2 g gærtørstof i 20 ml methanol 5 x 1 minuts disintegration i intervaller på et halvt minut, idet disintegrationen udføres ved en temperatur, der er højst 20°C, i en glaskuglemølle, der indeholder 15 g glaskugler med en diameter på 0,4 mm, hvor glaskuglemøllen er udstyret med en kølekappe med isvand.

10

De dyrknings- og bestemmelsesbetingelser, der er nævnt ovenfor, er anført for at standardisere dyrknings- og testmetoderne, således at det opnåede resultat vil afspejle den iboende astaxanthinproducerende evne af den pågældende gær.

Denne metode har ved adskillige forsøg udført af ansøgeren vist sig at være en egnet og reproducerbar metode, som er nem at udføre i praksis. Det skal bemærkes, at bestemmelsesmetoden ikke er den samme som den, der er anvendt hidtil i litteraturen. De i litteraturen hidtil anvendte metoder, jfr. for eksempel Eric A. Johnson et al., "Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma*", *Journal of general microbiology* 115, 1979, pp. 173-83, er baseret på absorbansen af en 1% (vægt/volumen) opløsning i acetone i en 1 cm cuvette på 1600, hvorimod den værdi, som opnås ved at måle astaxanthinstandard fra Hoffmann-La Roche, er 2100. Denne værdi er baseret på ansøgerens egne målinger såvel som på information fra Hoffmann-La Roche.

Den kendte bestemmelsesmetode måler endvidere gærens totale farveindhold, hvorimod den ovennævnte standardmetode, der anvendes i nærværende ansøgning, udelukkende måler astaxanthinindholdet. Når man sammenligner de værdier, der er opnået ved den ovennævnte standardiserede metode, med de værdier, der er anført i litteraturen, bør man være opmærksom på, at de værdier, der er anvendt i litteraturen, vil være betragteligt højere end de sande værdier, der opnås ved den ovennævnte standardiserede metode. Således bør der korrigeres for forskellen mellem ekstinktionskoefficienterne ved at multiplicere det totale pigmentindhold, der er anført i litteraturen, med 1600/2100 hver gang nærværende totale pigmentindhold sammenlignes med litteraturangivelserne.

35

De ovenfor anførte dyrkningsbetingelser er de, som ansøgeren har fundet at være reproducerbare og signifikante til bestemmelsen af den iboende astaxanthinproducerende evne. En mere detaljeret forklaring af dyrknings- og bestemmelsesbetingelserne, der anvendes til bestemmelse af gærstammens iboende astaxanthin-
5 producerende evne, er anført i forbindelse med eksemplerne.

Gærcellen ifølge opfindelsen tilhører arten *Phaffia rhodozyma*, idet denne er den eneste *Phaffia*-art, der er kendt på nuværende tidspunkt.

- 10 *Phaffia rhodozyma* er på nuværende tidspunkt den eneste kendte gær, der producerer astaxanthin. Vildtype *P. rhodozyma* er isoleret fra exudater fra løvfældende træer, og et eksempel på en sådan vildtypestamme er deponeret hos the American Type Culture Collection under deponeringsnr. ATCC 24261.
- 15 Vegetative *P. rhodozyma*-celler danner knopper, som heterobasidiomycete gær. Clamydosporer udvikles ved knopskydning, men promycelium og egentlig sporedannelse forekommer ikke. Clamydosporene er relativt store sfæriske celler med et større fedtindhold end vegetative celler. Forsøg på at krydse forskellige stammer i håb om at observere dikaryotisk mycelium- og teliosporedannelse er
20 ikke lykkedes. *P. rhodozyma* blev derfor klassificeret i slægten *Deuteromycotina* af ordenen *Blastomycetes* (jfr. M.W. Miller et al., "Phaffia, a new yeast genus in the deuteromycotina (*Blastomycetes*)", i *International Journal of Systematic Bacteriology* 26:2, 1976, pp. 286-291).
- 25 Vegetative celler er ellipsoide (3,6-7,5) x (5,5-10,5) μm og er i flydende medium til stede enkeltvis, i par og i nogle tilfælde i korte kæder eller små grupper. Der udvikles ikke et egentligt mycelium, men der kan være et rudimentært pseudomycelium til stede. Knopdannelse finder sted adskillige gange ud fra samme punkt på cellen. *P. rhodozyma* har en stærk cellemembran, der er sammensat af
30 mange lag, og et kapselmateriale, der giver overfladen et granulært udseende og forårsager den ovennævnte gruppeddannelse.
- Der er ikke blevet observeret nogen seksuel livscyklus. I løbet af clamydosporenes udvikling dannes vegetative celler ved knopskydning. Disse celler kan ikke
35 betragtes som værende promycelia med sporer som beskrevet for *Aessosporon*

(jfr. J.P. van der Walt, "The perfect and imperfect states of *Sporobolomyces salmicolor*, *J. Microbiol.Serol.* 36, 1970, pp. 49-55). Clamydosporerne kan ikke betragtes som værende gonotoconter (seksuelt segregerede sporer), og deres knopper kan ikke betragtes som værende den haploide generation. Det har ikke været muligt ved kernefarvning at demonstrere diploidisering på noget vækst-

5 stadium. Transmissionelektronmikrografer har kun vist en enkelt kerne under alle vækstfaser (jfr. M.W. Miller et al., *op.cit.*). *P. rhodozyma* er således sandsynligvis haploid, men dette er ikke bevist.

- 10 Efter 2-4 ugers vækst på YM agar (Difco Laboratories Incorporated, Difco manual: Dehydrated culture media and reagents for microbiology, 10th Edition, Detroit 1984) er stregkulturer orange til lakse-lyserøde, alt afhængig af stammen.

P. rhodozyma har den særlige egenskab, at den ikke gror ved temperaturer over

15 27°C. Den fermenterer D-glucose, maltose, saccharose og raffinose, hvorimod D-galactose og melibiose ikke fermenteres. De mest almindelige carbonkilder assimileres; D-galactose, L-sorbose, melibiose, lactose, glycerol og citrat assimileres imidlertid ikke. Gæren kan ikke gro i vitaminfrit medium uden tilsætning af biotin (M.W. Miller et al., *op.cit.*). De mest almindelige nitrogenkilder

20 assimileres, herunder urinstof. Kaliumnitrat og ethylamin assimileres ikke. Gæren kan ikke gro på 50 vægt% glucose gærekstrakt agar og heller ikke på 10 vægt% natriumchlorid gærekstrakt agar. Gærens syredannelse på kridtagar er svag, og dette gælder også gelatinesmeltning. Caseinhydrolyse, depolytisk aktivitet og vækst i nærværelse af 0,1 µg cycloheximid pr. ml finder ikke sted, hvorimod

25 gæren er i stand til syntetisere stivelseslignende forbindelser uafhængigt af pH. G+C-molprocenten er målt til 48,3±0,18 (jfr. Miller et al., *op.cit.*)

Under vækst under kulhydrat- og/eller nitrogenbegrænsede betingelser, og når den er underkastet fed-batch-fermenteringer, fremstiller *P. rhodozyma* trehalose som

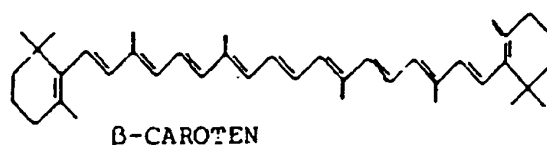
30 kulhydratlager. Dette er en helt ny observation, som er gjort af ansøgeren, og som ikke før er blevet rapporteret.

P. rhodozyma fremstiller et antal carotenoider, af hvilke astaxanthin udgør 83-87%, β-caroten 2-2,5%, echinenon 2-4% og phoenico-xanthin 5-7% ifølge

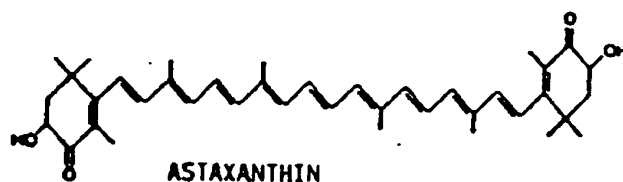
35 litteraturen. I praksis har forholdet mellem astaxanthin og totalpigment fremstillet

af *P. rhodozyma* imidlertid vist sig at variere betragteligt, alt efter dyrkningsbetingelserne for gærcellerne såvel som pigmentbestemmelsesmetoden, og har generelt vist sig at være i området 50-80%.

5



10



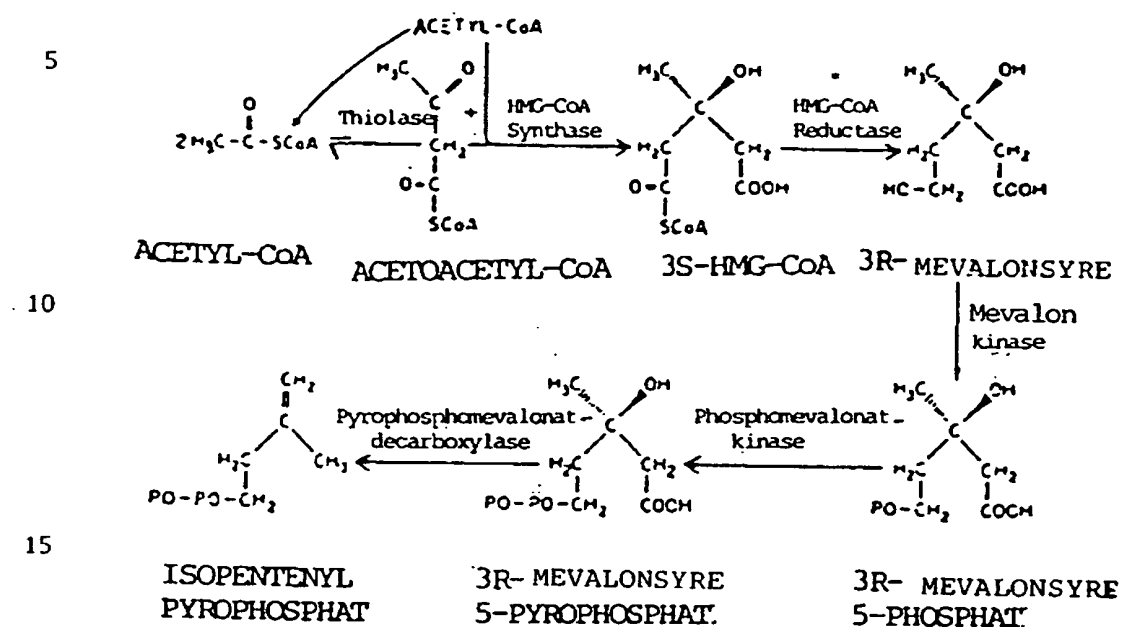
15

Alle hydroksylerede pigmenter, herunder astaxanthin, er blevet beskrevet som ubundne, ikke som estere eller andre derivater (Arthur G. Andrewes et al. "Carotenoids of *Phaffia rhodozyma*, a red-pigmented fermenting yeast", *Phytochemistry* 15, 1976, pp. 1003-1007). Der eksisterer tre optisk isomere astaxanthinformer: (3S,3'S), (3R,3'R) og (3S,3R), der hver findes i forskellige trans- og cis-konfigurationer. Det er blevet beskrevet, at *P. rhodozyma* kun fremstiller (3R,3'R)-astaxanthin (Arthur G. Andrewes et al., "(3R,3'R)-astaxanthin from the yeast *Phaffia rhodozyma*", *op.cit.*, pp. 1009-1011). I nærværende sammenhæng anvendes "astaxanthin" om trans- såvel som cis-konfigurationer af astaxanthin.

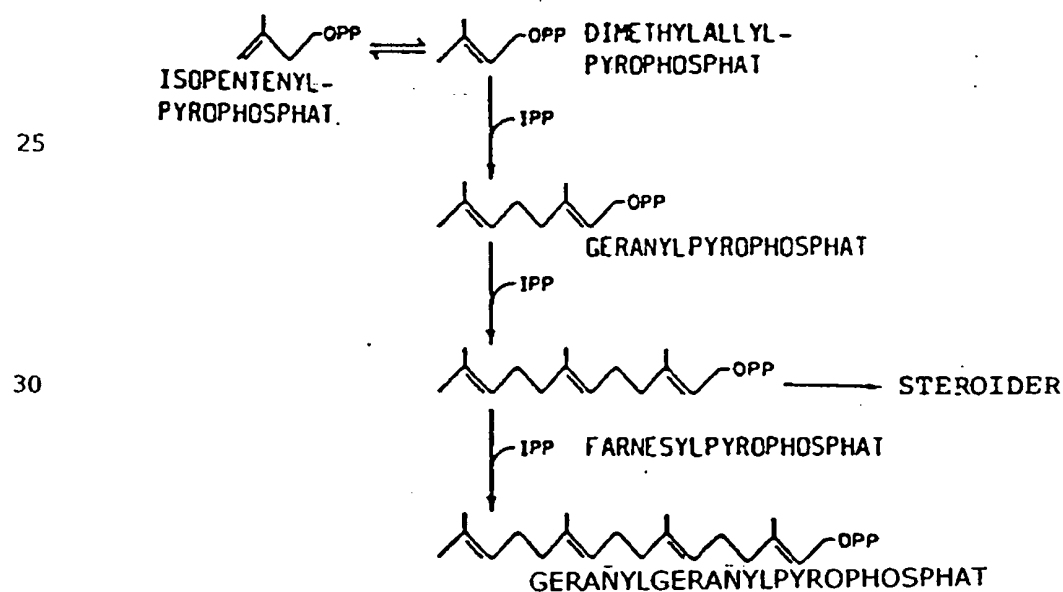
Pigmentet i de enkelte *P. rhodozyma*-celler er ikke synligt, når cellerne undersøges i mikroskop, hvilket antyder, at pigmentet kan være dispergeret i hele cellen. Det er imidlertid også muligt, at pigmentet er koncentreret i visse dele af cellerne.

Astaxanthin er et oxideret carotenoid og tilhører derfor xanthophylgruppen. I lighed med andre carotenoider er astaxanthin sammensat af 8 isoprenenheder. Ved

astaxanthinbiosyntesen, som er catabolitrepresseret, dannes isopentenylpyrophosphat fra acetyl-CoA som vist nedenfor:



Isopentenylpyrophosphat danner ved tre prenyltransferasereaktioner geranyl-
20 geranylpyrophosphat via geranylpyrophosphat og farnesylpyrophosphat som vist
nedenfor:



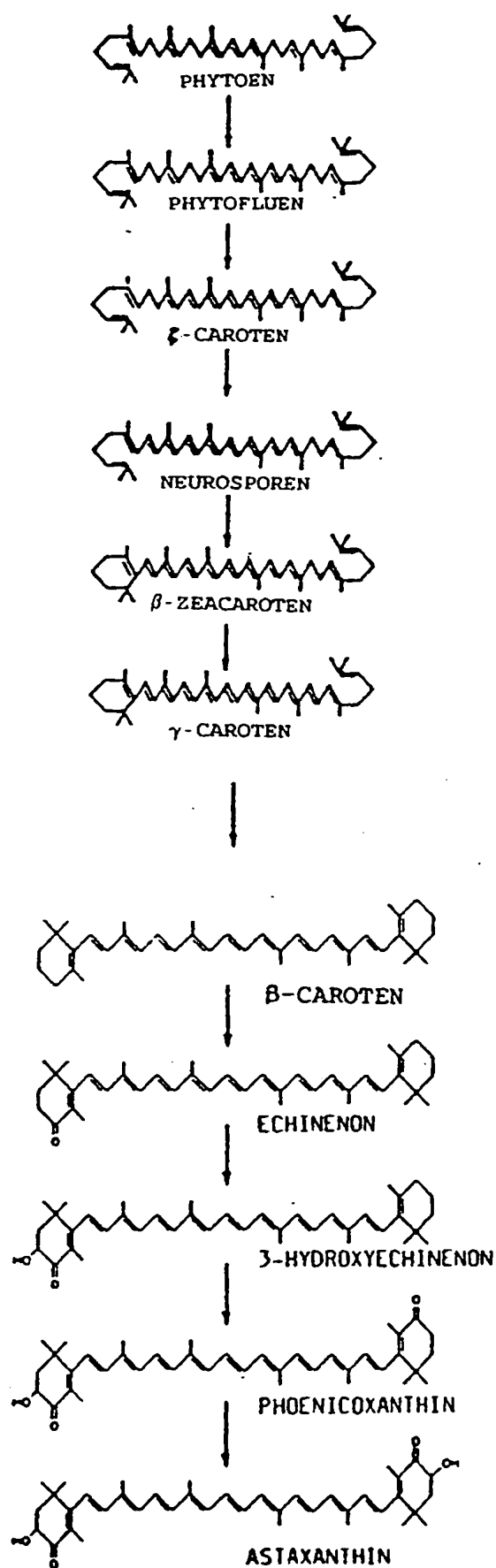
Kondensation af to-molekyler geranylgeranylpyrophosphat danner phytoen som, via dehydrogeneringstrin og ringdannelse, danner astaxanthin ud fra β -caroten.

Den sidste del af biosyntesen er utvetydigt blevet bestemt, men Andrewes et al.

5 (*op.cit.*) har foreslået den nedenfor viste metaboliske vej på basis af pigmentompositionen i *P. rhodozyma*:

9

5



Det enzymesystem, som omdanner geranylgeranylpyrophosphat til astaxanthin, kendes ikke, og man ved derfor ikke, hvorfor *P. rhodozyma* fremstiller (3R,3'R)-astaxanthin, og om der er nogle regulerende trin under denne del af biosyntesen. På den anden side er omdannelsen af acetyl-CoA til isopentenylpyrophosphat i isoprenproducerende organismer, der er forskellige fra *P. rhodozyma* og de enzymer, der tager del deri, blevet beskrevet relativt detaljeret. Der vides mindre om enzymerne, som omdanner isopentenylpyrophosphat til geranylgeranylpyrophosphat (isopentanyl pyrophosphatisomerase og prenyltransferase (J.W. Porter, S.L. Spurgeon (eds.), "Biosynthesis of isoprenoid compounds". New York, 1981-1983).

Proteinindholdet i *P. rhodozyma* varierer fra 25 til 50% af gærtørstof alt afhængig af dyrkningsbetingelserne. Dette er et relativt lavt proteinindhold. I modsætning hertil er fedtindholdet ekstraordinært højt (14-27%). Det formodes, at nukleinsyren udgør 8% i lighed med andre gær, og at aminosyresammensætningen ligner sammensætningen i andre kendte gær, såsom *Saccharomyces cerevisiae* og således har et meget lavt indhold af visse aminosyrer, for eksempel methionin og cystein (jfr. Gerald Reed og Henry J. Peppler, *Yeast Technology*, 1973, p. 329, udgivet af The AVI Publishing Company, Inc.). Dette og den totale gærsammensætning, som omfatter en høj mængde nukleinsyre, gør gæren uegnet som dyreernæring, når gæren er den eneste næringskilde, således som det er antydnet ovenfor. Gæren vil således ikke være en egnet hovednæringskomponent til fisk eller andre dyr uden tilsætning af visse aminosyrer og andre næringskilder.

Den totale mængde astaxanthin, som fremstilles af vildtype *P. rhodozyma*, når denne dyrkes under de normale kendte betingelser, er tilstrækkelig til at bibringe gærcellen en rød farve, men er ikke tilstrækkelig til at gøre isolering af astaxanthin fra gærcellerne økonomisk rentabel.

Ingen af de *Phaffia rhodozyma*-arter, der er beskrevet i litteraturen, har en iboende astaxanthinproducerende evne på mere end 600 µg pr. g gærtørstof, når det analyseres i overensstemmelse med de ovenfor anførte standardmetoder, se Tabel 2 og Tabel 6 i eksemplerne. Ifølge den foreliggende opfindelse har det imidlertid vist sig at være muligt at opnå gærceller, som iboende er i stand til at producere

astaxanthin i en mængde på mindst 600 µg pr. g gærtørstof, fortrinsvis mindst 700 µg pr. g gærtørstof, særligt mindst 1000 µg pr. gærtørstof, især mindst 1500 µg pr. gærtørstof, og i særdeleshed mindst 2000 µg pr. g gærtørstof, idet dyrkningen og evalueringen er udført ved de ovennævnte standardmetoder. Disse

5 gærceller kan fremstilles ud fra naturligt forekommende *Phaffia rhodozyma* ved mutagenese. Fremstilling af de omhandlede *Phaffia rhodozyma*-gærceller, der udviser den høje iboende astaxanthinproducerende evne, der er forklaret ovenfor, omfatter, at en *Phaffia rhodozyma*-gærcelle behandles med et mutagen, og der selekteres en resulterende mutant, der, når den dyrkes under de ovennævnte

10 betingelser, er i stand til at fremstille astaxanthin i en mængde på mindst 600 µg pr. g gærtørstof bestemt ved den ovenfor anførte fremgangsmåde.

Mutagenesen kan udføres som en enkelt mutagenese, men det har vist sig at være fordelagtigt at udføre to eller flere konsekutive mutageneser, idet det har vist sig,

15 at den iboende evne til at fremstille astaxanthin kan forbedres ved hvert mutagenesetrin. Den udgangsgærcelle, der underkastes mutagenese, er normalt en gærcelle, der, når den dyrkes under de ovennævnte betingelser, producerer astaxanthin i en mængde på mindre end 300 µg pr. g gærtørstof bestemt ved den ovennævnte metode, men det er klart, at en normal kandidat til mutagenesebe-

20 handlingen vil være en naturligt forekommende gærcelle, der har en så høj iboende astaxanthinproduktion som muligt. Sådanne gærceller er normalt gærceller, som tilhører slægten *Phaffia*, særligt gærceller, der tilhører arten *Phaffia rhodozyma*, således som det er nævnt ovenfor.

25 Mutagenesebehandlingen kan udføres under anvendelse af et hvilket som helst egnet mutagen (i nærværende sammenhæng skal udtrykket "mutagen" forstås i sin bredeste betydning som omfattende, for eksempel, ikke kun midler, som har en mutagenisk effekt, men også behandling, som har en mutagenisk effekt, såsom UV-bestråling). Eksempler på egnede mutagener er ethylmethansulphonat, UV-

30 bestråling, N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin, nucleotidbaseanaloger såsom bromouracil og acridiner, men det forventes, at et hvilket som helst andet effektivt mutagen vil være egnet til behandlingen.

I overensstemmelse med konventionelle mutageniseringsteknikker efterfølges

35 mutageniseringen af en hensigtsmæssig selektion af de celler, som har den højeste

astaxanthinproduktion. Idet astaxanthin er et pigment, kan denne selektion udføres relativt nemt ved hjælp af normale visuelle midler såsom simpel observation af enkeltkolonier. En alternativ metode er at analysere kulturer, der er fremstillet fra enkeltkolonier, for eksempel under anvendelse af de standardiserede dyrkningsbetingelser og bestemmelsesbetingelser, der er forklaret ovenfor.

En stamme, der blev fremstillet ved mutageniseringsmetoden ifølge opfindelsen, og som viser en særlig høj astaxanthinproduktivitet, blev deponeret den 6. april 1987 hos Centraalbureau voor Schimmelcultures, Oosterstraat 1, Postbus 273, NL-3740 AG Baarn, Holland (CBS) under 225-87, og en stamme, der er et reisolat af CBS 225-87 (se eksempel 1) blev deponeret den 23. marts 1988 hos CBS under deponeringsnr. 215-88, og et aspekt af den foreliggende opfindelse angår disse gærstammer såvel som mutanter deraf, som i det væsentlige har bevaret eller forbedret disse stammers astaxanthinproducerende evne.

15

Opfindelsen angår også en fremgangsmåde til fremstilling af astaxanthinholdige *Phaffia rhodoxyima*-gærceller eller celledele eller astaxanthin afledt fra disse gærceller eller celledele. Denne fremgangsmåde er ejendommelig ved, at astaxanthinproducerende *Phaffia rhodoxyima*-gærceller dyrkes under aerobe betingelser i et medium, der indeholder kulhydratkilder, assimilerbare nitrogen- og phosphorkilder, mikronæringsstoffer og biotin eller desthiobiotin ved en temperatur i området 15-26°C, således at der opnås en biomasse, der indeholder astaxanthin i en mængde på mindst 600 µg pr. g gærtørstof bestemt ved den ovenfor anførte fremgangsmåde, og eventuelt at ét eller flere af de følgende trin udføres i arbitrær rækkefølge:

- Cellerne høstes fra kulturen, således at der opnås en gærfløde,
- cellerne åbnes, for eksempel ved at ødelægge cellevæggene ved hjælp af mekanisk, kemisk og/eller enzymatisk behandling og/eller at cellerne underkastes sonikering, autolyse, osmolyse og/eller plasmolyse, eventuelt med tilsætning af egnede midler såsom detergenter, syrer, baser, enzymer, autolyse-forøgende stoffer, osmolyserende midler, såsom salte, og/eller plasmolyserende midler,
- cellerne homogeniseres til opnåelse af et homogenat,

- cellerne, cellefragmenterne eller homogenatet tørres, fortrinsvis ved et vandindhold på højst 12 vægt%, fortrinsvis højst 10%,
- astaxanthin ekstraheres fra cellerne, cellefragmenterne eller homogenatet.

5

Den ovenfor anførte astaxanthinmængde, 600 µg pr. g gærtørstof, er højere end nogen astaxanthinkoncentration, der er beskrevet i litteraturen. Selv om Johnson et al. *op. cit.* beskriver et astaxanthinindhold på 295 µg pr. g gærtørstof, omfatter denne værdi ikke alene astaxanthinindholdet men faktisk gærcellens totale pigmentindhold. Dette pigmentindhold blev ydermere målt under anvendelse af en absorptionsværdi af 1% (vægt/volumen) opløsning i acetone i 1 cm cuvette på 1600, hvilket er lavere end den, der er målt af nærværende ansøgere (2100), således at den værdi, der er beskrevet af Johnson et al., svarer til allerhøjst $295 \times 1600/2100 = 225$ µg totalpigment (ikke kun astaxanthin) pr. g gærtørstof. Dette pigmentindhold fra litteraturen bør sammenlignes med det totale pigmentindhold af gærstammerne ifølge den foreliggende opfindelse, hvilket pigmentindhold er 1176 µg/g gærtørstof fra stammen CBS 225-87 og ca. 1340 µg/g gærtørstof fra stammen CBS 215-88 eller endog højere, for eksempel mindst 2000 µg/g gærtørstof.

20

Den høje astaxanthinkoncentration i gærcellerne ifølge opfindelsen kan opnås dels ved at anvende særlige dyrkningsbetingelser, som vil blive beskrevet nedenfor, og dels ved at selekttere en gærstamme med en høj iboende astaxanthinproduktivitet, fortrinsvis en gærstamme som beskrevet ovenfor, og det foretrækkes især at kombinere de særlige dyrkningsbetingelser og anvendelsen af særlige astaxanthinproducerende gærstammer.

Dyrkningen udføres fortrinsvis som fed-batch-fermentering under betingelser, hvor der så godt som ikke dannes alkohol. Som nævnt ovenfor er dyrkningstemperaturen i området 15-26°C. Under 15°C har væksten tendens til at blive for langsom til at være acceptabel til industriel produktion, og over 26°C er kulturens levedygtighed alvorligt svækket. Det foretrukne temperaturområde er 20-22°C.

Fermenteringen eller i det mindste en del deraf udføres normalt i et medium, der omfatter egnede makro- og mikronæringsstoffer for cellerne, såsom melasse eller

35

- saccharose som kulhydratkilde og nitrogenkilder såsom majsstøbevæske, ammoniumsulphat, ammoniumphosphat, ammoniumhydroxid eller urinstof, phosphatkilder, såsom ammoniumphosphat og phosphorsyre, og tilsatte mikronæringsstoffer eller mineralsalte såsom magnesiumsulphat, zinksulphat og biotin eller
- 5 desthiobiotin. Melasse eller saccharose tilsættes fortrinsvis til mediet adskilt fra de andre komponenter i overensstemmelse med konventionelle fremgangsmåder ved gærproduktion. Når mediet omfatter melasse, har det vist sig, at gærcellens vækst påvirkes af sukkerkoncentrationen eller andre væksthæmmende dele deri i fermentoren. Denne virkning er ikke observeret, når mediet omfatter majsstøbe-
- 10 væske eller fast stof. Det kan derfor være fordelagtigt at regulere fermenteringen, således at sukkerkoncentrationen (udtrykt som den totale koncentration af glucose og saccharose) i fermentoren er højst 8 g/l, fortrinsvis højst 5 g/l, og især højst 1 g/l.
- 15 Kulturen beluftes under hele fermenteringen, dvs. den dyrkes under aerobe betingelser. Med udtrykket "aerobe betingelser" menes, at oxygentilførslen bør være tilstrækkelig til, at der i det væsentlige ikke vil være nogen oxygenbegrænsning under fermenteringen.
- 20 Ifølge et særligt aspekt af den foreliggende opfindelse, således som det er antydnet ovenfor, forøges astaxanthinkoncentrationen i den opnåede biomasse ved at udføre dyrkningen under udvalgte betingelser. Disse betingelser omfatter en dyrkning, som omfatter en vækstfase under betingelser, som i det væsentlige er tilstrækkelige under i det væsentlige alle vækstbetingelser, og en efterfølgende vækstbe-
- 25 grænset fase. Den vækstbegrænsede fase etableres fortrinsvis ved at tilvejebringe betingelser, hvor dyrkningsmediet under fortsat beluftning mangler mindst en vækstfaktor, således at produktionen af astaxanthin forøges under den efterfølgende fase.
- 30 Den vækstbegrænsede fase skal generelt forstås således, at det er en fase, i hvilken hovedparten af *Phaffia rhodoxyma*-cellerne er ophørt med at gro. Denne fase findes naturligvis, når mediet mangler i det mindste en vækstfaktor, men observeres også under den sidste del af kulhydrattilsætningsperioden, når mængden af celler, der er til stede i fermentoren, er langt større end fermentorens beluft-
- 35 ningskapacitet.

Det vides ikke, hvorfor den efterfølgende vækstbegrænsede fase har den overraskende virkning, at den øger astaxanthinproduktionen betragteligt, men det formodes, at astaxanthinprecursorer produceres under vækstfasen, og at den

5 efterfølgende vækstbegrænsede fase tilvejebringer betingelser, som fremmer slutproduktionen af astaxanthin, muligvis oxiderende betingelser med overskud af oxygen, som bliver tilgængeligt, når væksten termineres. Det synes i hvert fald at være essentielt, at beluftningen fortsættes under den efterfølgende vækstbegrænsede fase. Varigheden af den efterfølgende vækstbegrænsede fase er fortrinsvis

10 mindst 16 timer, såsom 16-24 timer, idet kortere varigheder kan tendere til at reducere den ekstraopnåelige virkning, hvorimod der ikke synes at kunne opnås nogen væsentlig virkning ved at forlænge den vækstbegrænsede fase til mere end 24 timer.

15 Udtrykt på en funktionel måde bør betingelserne i den vækstbegrænsede fase tilpasses således, at den forøger astaxanthinproduktionen mindst 1,2 gange den produktion, der opnås uden den efterfølgende fase, såsom mindst 1,3 gange den produktion, der opnås uden den efterfølgende fase, fortrinsvis 1,4 gange den produktion, der opnås uden den efterfølgende fase, og mest foretrukket mindst 1,5

20 gange den produktion, der opnås uden den efterfølgende fase.

Gærcellen, der underkastes den særlige dyrkning med den efterfølgende vækstfase, er en *Phaffia rhodoxyma*-gærcelle ifølge opfindelsen, hvilken gærcelle har en iboende og forbedret evne til at producere astaxanthin, typisk en gærcelle,

25 der er opnået ved mutagenisering som forklaret ovenfor. Med disse gærceller med en iboende forøget astaxanthinproduktion kan astaxanthinkoncentrationen i biomassen, der opnås, når den særlige dyrkningsmetode, der omfatter en vækstbegrænset fase, anvendes, være mindst 600, fortrinsvis mindst 800, især mindst 1000 µg pr. g gærtørstof, især mindst 1500 µg pr. g gærtørstof, for

30 eksempel mindst 2000 µg pr. g gærtørstof, og mest foretrukket mindst 3000 µg pr. g gærtørstof bestemt som anført ovenfor.

Normalt, og således som det anvendes ovenfor, angives det totale pigmentindhold og astaxanthinindhold i gærcellerne eller gærcelledelene som µg/g gærtørstof. Det

35 kan imidlertid vise sig, at andre måder at anføre det totale pigment- og astaxan-

thinindhold kan være hensigtsmæssig. Det kan for eksempel være anvendeligt at anføre det totale pigmentindhold og astaxanthinindhold som $\mu\text{g/ml}$ af den suspension, i hvilken det er til stede, for eksempel i dyrkningsmediet. Derved vil det ikke være nødvendigt at bestemme gærtørstovægten af de gærceller, fra hvilke

5 astaxanthinet eller det totale pigment isoleres. Således kan astaxanthin- og/eller det totale pigmentindhold af gærcellerne let bestemmes under fermenteringen eller dyrkningen af gærcellerne.

Efter den ovenfor beskrevne dyrkning til opnåelse af gærceller, der har et højt

10 astaxanthinindhold, kan kulturen underkastes de ovenfor nævnte efterfølgende behandlinger til at isolere gærcellerne og/eller forberede dem til deres efterfølgende anvendelse såsom ved at ødelægge cellerne, og/eller astaxanthin kan ekstraheres fra cellerne.

15 De følgende vigtige eksempler på disse behandlinger beskrives i nærmere detaljer:

Cellerne kan ødelægges ved at underkaste dem et forøget tryk og derefter frigive trykket.

20 Cellerne kan underkastes det forøgede tryk og frigivelse af trykket ved at blive transporteret gennem et system, der omfatter en ventilhomogenisator, hvor det forøgede tryk bygges op foran ventilhomogenisatoren. Ventilhomogenisatoren omfatter typisk en aerojet, gennem hvilken celleduspensionen passerer under højt tryk, og et obstruktionselement, som jet'en rammer i det væsentlige efter passage

25 gennem ventilen. Eksempler på celleødelæggelsesventiler er beskrevet i APV Gaulin Technical Bulletin No. 74, marts 1985 (APV Gaulin International SA, P.O. Box 58, 1200 AB Hilversum, Holland), hvortil der henvises. Som et eksempel på en egnet celleødelæggeshomogenisator kan der nævnes en APV Gaulin MC4-homogenisator med en celleødelæggelsesventil af typen CR, der er beskrevet i oven-

30 nævnte publikation. Homogenisatoren er forbundet med en varmeveksler, gennem hvilken suspensionen omfattende ødelagte celler passerer fra celleødelæggelsesventilen. Celleduspensionens tryk foran ventilen kan for eksempel være ca. 400-1200 bar, såsom for eksempel ca. 700 bar. Denne behandling kan for eksempel gentages 3 gange med mellemliggende afkøling af homogenatet i varmeveksleren.

Som forklaret ovenfor er det nødvendigt, at cellerne ødelægges eller behandles på anden vis, når de skal anvendes i foder, idet udnyttelsen af astaxanthinindholdet i høj grad afhænger af det celleindhold, der er tilgængeligt for det pågældende dyrs fordøjelsessystem. Der opnås således hovedsageligt ikke nogen farvningseffekt, 5 når fisk fodres med foder indeholdende ikke-ødelagte astaxanthinholdige celler.

De ødelagte gærceller kan underkastes ultrafiltrering eller fordampning til at koncentrere de ødelagte celler. Ultrafiltreringen kan for eksempel udføres i et laboratorieenhedssystem, der er tilgængeligt fra De Danske Sukkerfabrikker, for 10 eksempel et system 37, der omfatter tre filtreringsenheder med et totalt filterareal på 0,88 m² af en ultrafiltreringmembran af typen RC70. En anden metode til koncentration af de ødelagte celler er at udføre vakuumafdamning af vand fra celleduspensionen.

15 De ødelagte celler kan tørres ved spraytørring eller tromletørring. Før tørring tilsættes fortrinsvis bærere såsom natriumcaseinat, antioxidanter og/eller emulgatorer. Spraytørring kan for eksempel udføres ved at underkaste en homogent blandet opslæmning af de ødelagte celler og eventuelt en bærer som natriumcaseinat, fortrinsvis i form af en vandig opløsning, til spraytørring. Spray- 20 tørring kan hensigtsmæssigt udføres ved at blande den vandige natriumcaseinatopløsning med gæroplæmningen, således at der opnås en natriumcaseinatkoncentration på ca. 2-10% (vægt/volumen). Den resulterende blanding får derefter lov til at stå under omrøring i en nitrogen atmosfære, før den pumpes ind i et spraytørringstårn, i hvilket den underkastes tørring ved en temperatur på for eksempel 25 150-230°C, såsom ca. 180°C til reduktion af gærcellematerialets vandindhold, for eksempel til højst 10 vægt%. Gærcellematerialet atomiseres derefter efterfølgende ved hjælp af et sprayhjul. Det pulverformede gærmateriale, der resulterer fra spraytørringsbehandlingen, isoleres hensigtsmæssigt ved hjælp af en cyclon og sies og pakkes eventuelt derefter. Et eksempel på et egnet spraytørringsudstyr er 30 et spraytårn af typen EAK-1 fra Anhydro. De ødelagte gærceller kan alternativt underkastes tromletørring, for eksempel i et lukket tromletørringsudstyr ved en temperatur på 150-200°C.

Idet astaxanthinet meget nemt dekomponeres ved høje temperaturer, er

det vigtigt, at de ødelagte gærceller underkastes høje temperaturer i så kort tid som muligt. Idet astaxanthin endvidere er oxygensensitivt, bør tørringen fortrinsvis udføres under ikke-oxyderende betingelser, for eksempel i en inert atmosfære såsom vanddamp (som kan være det vanddamp, der afdampes fra gærsuspensionen), nitrogen og/eller carbondioxid.

Før tørringen blandes de ødelagte celler eventuelt med egnede emulgatorer, såsom sorbitan monostearat eller antioxidant, butylhydroxytoluen (BHT), butylhydroxyanisol (BHA), vitamin E, ascorbinsyre, (II) sulphat- eller (II) phosphatestere af ascorbinsyre eller ascorbylpalmitat.

Tørrede, ødelagte celler kan umiddelbart anvendes som bestanddele i dyrefoder, som det vil blive forklaret nedenfor.

- 15 Astaxanthinindholdet af gærcellerne kan ekstraheres fra disse under anvendelse af forskellige ekstraktionsmidler og ekstraktionsprocedurer - for således at sikre, at der opnås en i det væsentlige total ekstraktion af astaxanthin fra gærcellerne. I de fleste tilfælde skal ekstraktionen udføres i ødelagt cellemateriale. Det ødelagte cellemateriale, der kan være tørt eller vådt, kan således ekstraheres med et
- 20 organisk opløsningsmiddel, såsom petroleumsether, der hensigtsmæssigt kan anvendes i tilfælde af vådt cellemateriale, idet petroleumsetheren danner en fase, der er adskilt fra vandfasen. Andre egnede organiske opløsningsmidler er acetone eller alkoholer såsom methanol eller ethanol, ethere, ketoner og chlorerede hydrocarboner. Ved ekstraktionen opløses astaxanthin i det organiske opløsningsmiddel.
- 25 Astaxanthinet kan opnås ved at fjerne opløsningsmidlet fra opløsningen, såsom ved afdampning i et faldende filmafdampningssystem før tørring. Et koncentrat af astaxanthin i det organiske opløsningsmiddel kan imidlertid også være hensigtsmæssig til visse formål. Et koncentrat kan anvendes i sig selv til fremstillingen af foder eller næringsmiddel, eller koncentratet kan fortyndes og anvendes i den
- 30 fortyndede tilstand ved fremstillingen af foder eller levnedsmidler, for eksempel ved at imprægnere foder- eller næringsmiddelbestanddele med opløsningen eller ved at anvende opløsningen (eller koncentratet) til at farve næringsmiddelbestanddele såsom olier eller fedtstoffer.

Astaxanthinet kan også ekstraheres fra gærceller under anvendelse af carbon-dioxid under superkritiske betingelser. Carbondioxidet kan eventuelt anvendes sammen med egnede blandere, såsom organiske opløsningsmidler, især opløsningsmidler af den ovenfor nævnte type, eller opløsningsmidler, såsom chloroform eller acetonitril, eller iseddikesyre. De gærceller, der er underkastet superkritisk ekstraktion, kan være våde eller tørre hele gærceller eller ødelagte, for eksempel homogeniserede gærceller.

En foretrukken metode til isolering af hele astaxanthinholdige celler fra kulturen er at filtrere gærfløden, for eksempel på en filterpresse eller et roterende tromlefilter, for således at opnå en filterkage, for eksempel med et tørstofindhold på ca. 25-35%. Filterkagen kan hensigtsmæssigt ekstruderes i strenge, for eksempel i strenge med en diameter på ca. 0,5-2,0 mm i en ekstruder, der er udstyret med en perforeret plade, for således at opnå strenge, der består af gærpartikler. Strengene ekstruderes fortrinsvis direkte ud i varm luft i en fluid bed, hvor de tørres. Inddampningen i fluid bed'en reguleres fortrinsvis således, at gærpartiklernes temperatur holdes under 50°C såsom ved 30-40°C, og processen afsluttes, når vandindholdet er bragt ned til under 10 vægt%, fortrinsvis under 8% bestemt ved gærtørstofindholdet (proceduren er beskrevet i eksemplerne). Tørringen kan alternativt udføres i en bakketørrer under de samme betingelser som i fluid bed'en. Det tørrede, hele cellemateriale kan derefter findeles i en kuglerørmølle, såsom en Coball®-mølle, hvorefter den underkastes ekstraktion.

Ifølge en særlig fremgangsmåde kan tørret helcellemateriale, for eksempel opnået som beskrevet ovenfor, blandes med en olieagtig fase, såsom en spiselig olie eller et spiseligt fedtstof, såsom soyabønneolie eller fiskeolie eller et andet organisk opløsningsmiddel såsom et opløsningsmiddel af den ovenfor omtalte type. Temperaturen er fortrinsvis i området 20-30°C. Den blanding, der er opnået fra cellematerialet, og den olieagtige fase eller det organiske opløsningsmiddel kan males i en mølle, såsom en kuglemølle, for eksempel en kuglerørmølle, såsom en Coball®-mølle, for at ødelægge cellerne og frigive astaxanthin fra cellerne. Den resulterende suspension kan i sig selv anvendes i foder, eller den olieagtige fase, der indeholder astaxanthinet, kan skilles fra cellerester før anvendelse. Adskillelsen udføres hensigtsmæssigt ved centrifugering i en hurtigtkørende centrifuge; det samme princip som anvendes ved separation af bakterier fra ølurt. En anden

mulighed er naturligvis at blande ødelagt, tørret cellemateriale, der er opnået ved de ovenfor omtalte metoder, med en olieagtig fase på en lignende måde for at ekstrahere astaxanthinen i den olieagtige fase og udføre separationen som beskrevet ovenfor. Den olieagtige fase kan anvendes til farvning af foder på

5 samme måde som beskrevet ovenfor.

I modsætning til de fleste traditionelle ekstraktionsprocedurer, der som anført ovenfor er udført på ødelagt cellemateriale, har det vist sig, at iseddikesyre med succes kan anvendes til at ekstrahere astaxanthin fra hele, ikke-ødelagte gær-

10 celler. Astaxanthin kan således ekstraheres fra hele gærceller med et opløsningsmiddel, der omfatter iseddikesyre, idet ekstraktionen fortrinsvis udføres ved en temperatur over opløsningsmidlets frysepunkt, for eksempel i området 20-100°C, fortrinsvis i området 20-80°C, og især i området 20-60°C. Det formodes, at det er muligt at opnå en mere selektiv astaxanthinekstraktion, når ekstraktionen udføres

15 ved de lavere temperaturer, idet medfølgende ekstraktion af fedt eller andre ekstarherbare komponenter vil være begrænset ved disse lave temperaturer. Iseddikesyrekoncentrationen i opløsningsmidlet er fortrinsvis i området 5-100, 10-70. Ekstraktionen med iseddikesyre resulterer i en ekstraktion af cellernes pigment på ca. 70-90%, dvs. i det væsentlige hele gærcellernes pigment- og astaxanthin-

20 indhold findes i iseddikesyreekstrakten. Derudover indeholder ekstrakten normalt 30-35% gærtørstof. Gæren, der underkastes ekstraktion med iseddikesyre, er hensigtsmæssigt i form af tørret gær, for eksempel gær, som er blevet filtreret og efterfølgende ekstruderet ud i en fluid bed, hvori den er tørret, idet således behandlede gærceller ikke vil blive ødelagt under ekstraktionsbehandlingen

25 (medmindre ekstraktionsbehandlingen omfatter kraftig mekanisk behandling af gærcellerne). Dette vil lette den efterfølgende separation af ekstrakten, der indeholder pigmentet fra gærcellerne, i sammenligning med ekstraktion af ødelagte eller homogeniserede celler, som på grund af deres relativt ringe størrelse i sammenligning med ikke ødelagte celler i stor udstrækning har tendens til at

30 blokere porerne i det anvendte filter. Iseddikesyreekstraktionen er illustreret i eksempel 8. Ekstraktion af våde gærceller med iseddikesyre kan også være anvendelig.

Det ekstraherede astraxanthin såvel som det tørrede hele cellemateriale holdes

35 fortrinsvis under oxygenmangel for således at beskytte astaxanthinet fra

dekomponering. De astaxanthinholdige gærceller eller den ekstraherede astaxanthin er således fortrinsvis beskyttet ved hjælp af antioxidanter såsom butylhydroxyanisol (BHA), butylhydroxytoluen (BHT), vitamin E eller ascorbinsyre, (II) sulphat- eller (II) phosphatestre af ascorbinsyre eller ascorbylplamitat

5 og/eller emulgatorer såsom monoglycerider eller sorbitanestre og holdes hensigtsmæssigt under hermetiske betingelser.

Opfindelsen angår også et dyrefoder, som er ejendommeligt ved, at det omfatter *Phaffia rhodozyma*-gærceller ifølge krav 1 eller gærcelledele, der indeholder

10 astaxanthin i en mængde på mindst 600 µg pr. g gærtørstof bestemt som beskrevet i krav 1, fx gærceller ifølge krav 1-2 eller dele deraf eller gærceller eller gærcelledele fremstillet ved fremgangsmåden ifølge et hvilket som helst af kravene 3-8, sammen med andre foderbestanddele, hvor de astaxanthinholdige gærceller eller gærcelledele udgør højst 10 vægt% af det totale tørstof af dyrefodersammen-

15 sætningen, fortrinsvis højst 5% og især højst 3%, idet de andre komponenter er valgt fra protein- og kulhydratkilder såsom fiskemel, valle, blodmel, vegetabilsk mel, fedtstoffer såsom fiskeolie og vegetabiliske olier, vitaminer og mineraler. Disse værdier er beregnet på basis af slutfoderet, med hvilket dyrene skal fodres. Det er også muligt at fremstille foderforblandinger, der har en højere koncentration af

20 gærceller. Gærcellerne eller gærcelledele eller astaxanthinet blandes eventuelt med emulgatorer, som er i stand til at gøre astaxanthinet dispergerbart i vand. Herudover kan de astaxanthinholdige gærceller eller gærcelledele beskyttes mod oxidation ved hjælp af de ovennævnte anti-oxidanter og/eller emulgatorer, og/eller det animalske foder kan pakkes i lufttætte og eventuelt evakuerede beholdere.

25 De astaxanthinholdige, tørrede gærceller kan også pakkes *per se* til anvendelse som en foderbestanddel, hvor slutfoderblandingen fremstilles på anvendelsesstedet, eller gærcellerne administreres *per se* til dyrene, som på anden vis fodres med normale eller tilpassede foderblandinger.

30 Gærcellerne eller gærcelledele blandes hensigtsmæssigt og normalt med andre næringskomponenter, som fortrinsvis er valgt blandt protein og kulhydratkilder, fedtstoffer eller olier og mikronæringsstoffer, såsom vitaminer og mineraler. Casein, albumin, hvedegluten, fiskemel, koncentrerede fiskeaffaldsprodukter

35 (fiskelimmel og -blodmel) kan nævnes som eksempler på proteinkilder. Som

- eksempler på kulhydratkilder kan nævnes gelatiniseret stivelse, ekstruderet hvedemelasse, vegetabilsk mel og majsstivelse. Fedtbestanddelene i foderet kan for eksempel være fiskeolie og torskeleverolie og/eller vegetabiliske olier såsom majsolier. Mineralerne kan vælges, for eksempel blandt uorganiske eller simple
- 5 organiske forbindelser af calcium, phosphor, natrium, kalium, chlor, magnesium, kobber, mangan, zink, cobalt og selen. Som eksempler på vitaminer kan nævnes vitamin B₁₂, prolin, vitamin A, vitamin D, vitamin E, vitamin K, thiamin, ascorbinsyre, riboflavin, pyrodoxin, panthotensyre, niacin, biotin, cholin og inositol.
- 10 Astaxanthin, som er blevet ekstraheret fra gærceller, for eksempel ved hjælp af en hvilken som helst af de ovennævnte metoder, fortrinsvis fra gærceller ifølge opfindelsen eller gærceller, der er fremstillet ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen, kan anvendes sammen med de ovenfor beskrevne foderbestanddele og også sammen med andre næringsmiddel- eller næringsstofkomponenter og iblandet andre
- 15 pigmenter. Astaxanthin ekstraheret fra gærceller er således velegnet alene eller sammen med andre pigmenter til anvendelse i spiselige olier, smør, margarine, shortening, mayonnaise, patéer, suppe, snacks, surimibaserede produkter, desserter, is, konfekturer, bagte produkter og drikkevarer. Når astaxanthinet anvendes i foder, som i hovedparten består af vand eller vandfaser, blandes
- 20 astaxanthinet fortrinsvis med en emulgator som beskrevet ovenfor, hvilket gør astaxanthinet dispergerbart i vandfasen uden at tendere til krystallisering og uden nødvendigheden af at tilsætte en olieagtig fase for at opløse astaxanthinet.

- Opfindelsen angår ydermere en fremgangsmåde til fordring af dyr til opnåelse af en
- 25 rødlig pigmentering af deres kød og/eller produkter, der produceres af dyrene, hvilken fremgangsmåde er ejendommelig ved, at der til dyrene administreres et foder, der indeholder *Phaffia rhodozyma*-gærceller ifølge krav 1 eller celledele indeholdende astaxanthin, i en mængde på mindst 600 µg pr. g gærtørstof bestemt ved den i krav 1 anførte metode, idet dyrene fortrinsvis er fisk, især laks eller
- 30 havørred, køer til farvning af deres smør eller fjerkræ til farvning af deres æggeblommer.

- Den mængde foder, der indeholder astaxanthinet eller astaxanthinholdige gærceller, der administreres til dyrene, vil afhænge af den pågældende dyreart og
- 35 af den pigmenteringsvirkning, som det er ønsket at opnå ved hjælp af

- astaxanthinet. Det er klart, at det princip, der skal følges, er, at dyret bør have en normal anbefalet daglig mængde makro- og mikronæringsstoffer og derudover astaxanthin i en form og en mængde, som vil resultere i den ønskede pigmentering af dyrets kød eller det pågældende animalske produkt. I visse tilfælde vil den
- 5 mængde astaxanthin, der skal administreres, være sæsonafhængig; det vil således for eksempel ikke normalt foretrækkes at administrere astaxanthin eller andre carotenoider til køer for at opnå en pigmentering af smørret om sommeren, idet smørpigmenteringen normalt betragtes som passende, når køerne græsser. Den mængde, i hvilken det foder, der indeholder astaxanthinet eller de
- 10 astaxanthinholdige gærceller eller celledele, administreres til dyrene, kan også i visse tilfælde være sæsonafhængig. I tilfælde af fisk, såsom laks eller havørred, kan den mængde foder, der indtages af fisken om vinteren, således for eksempel være relativt lav, hvilket er i modsætning til den mængde, der indtages af fisken om sommeren. En egnet mængde foder, der administreres til fisken, kan imidlertid
- 15 være ca. 1,5% af fiskelegemsvægten pr. dag, hvilket svarer til de anbefalinger, der gives af the California State Department of Fish and Game.

- Når fjerkræ fodres ved den ovenfor fremførte fremgangsmåde for at pigmentere æggeblommerne, der produceres af fjerkræet og/eller fjerkræets kød eller skind,
- 20 kan foderet bestå af konventionelle fjerkræfoderkomponenter, hvor et eksempel er et foder, der fortrinsvis består af protein- og kulhydratkilder såsom soyabønnemel, soyabønneprotein, cellulose, stivelse og fedtkilder, såsom soyabønneolie, vitaminer, såsom et generelt vitaminmix og mineraler, såsom en blanding af de almindelige mineralkomponenter for fjerkræ såvel som calciumkilder til ægge-
- 25 skallerne, hvor calciumkilderne fortrinsvis er calciumcarbonat og calciumhydrogenphosphat. En lille mængde natriumchlorid kan også være til stede. Foderet kan administreres i en traditionel dosis.

Opfindelsen illustreres yderligere i de følgende eksempler:

MATERIALER OG METODER

Opretholdelse af kulturer

5 *Phaffia rhodozyma*-kulturer opretholdes på to måder:

- 1) På skråagar (YM-agar). Skråagarkulturene inkuberes i en uge ved 20°C og holdes ved 4°C i en måned, gendyrkes i YM-medium, før nye skråagarkulturer fremstilles.

10

- 2) Cryoopbevarelse ved -80°C. Stammer fra cryohætteglas eller skråagar inokuleres i 50 ml YM-medium i 250 ml rystekolber.

15

Rystekolben inkuberes på en orbitshaker (150 omdr. pr. minut) ved 20°C i 4-5 dage. Gærcellerne lades sedimentere, og væsken dekanteres fra. Bundfaldet blandes med glycerol til en koncentration på 20%, hældes i cryohætteglas og opbevares i dybfryser ved -80°C.

Bestemmelse af gærtørstofindhold

20

5 ml gærcellekultur centrifugeres i et udvejet Sarstedt-rør (som er blevet tørret til konstant vægt ved 110°C) ved 10.000 x g i 5 minutter og vaskes to gange i demineraliseret vand. Væsken fjernes ved dekantering, og vægten af røret med cellerne måles efter tørring til konstant vægt ved 110°C, hvilket giver gær-cellevægten (Y g). Gærtørstofindholdet (YDMC) beregnes derefter som:

25

$$\text{YDMC (g/l)} = Y/5,00 \times 1.000$$

Det anførte indhold er middelværdi af to bestemmelser.

30

Spektrofotometrisk bestemmelse af totalt pigmentindhold

Det totale pigmentindhold i en methanolekstrakt bestemmes fotometrisk ved hjælp af λ_{max} og Beer's law som beskrevet af B.H. Davies, "Carotenoids", i T.W. Goodwin 35 (ed.), *Chemistry and Biochemistry of plant pigments*, New York, 1976, 2. udg., p.

149. Det anvendte spektrofotometer er et Shimadzu UV visible recording-spektrofotometer UV 260. Pigmentindhold beregnes under anvendelse af formlerne 1, 1a, 2, 2a nedenfor og ekstinktionskoefficienterne fra tabel 1 nedenfor.

5

TABEL 1

Ekstinktionskoefficienter for astaxanthinstandarden i forskellige opløsningsmidler fremstillet som beskrevet for standardopløsningen ovenfor

10

	Opløsningsmiddel	Absorptions- maksimum	$E_{1\%}^{1\text{cm}}$
15	Acetone	475	2105
	Methanol	472	2100
	Ethanol	476	2100
	Iseddikesyre	482	1856

$E_{1\%}^{1\text{cm}}$ = adsorbans af 1% (vægt/volumen) opløsning i en 1 cm cuvette
1cm

20

Pigmentekstraktionsanalyse - metode 1

- Ca. 30 ml af gærkulturen blev overført til Sarstedt-rør og centrifugeret i 5 minutter ved 10.000 x g. Gærcellerne blev vasket i demineraliseret vand og suspenderet i
- 25 ca. 20 ml methanol. Til en glaskuglemølle af typen Bead Beater (Biospec Products Inc., U.S.A.), i hvilken rotoren var dækket med glaskugler med en diameter på 0,4 mm (ca. 15 g glaskugler), blev methanolsuspensionen tilsat til opfyldning af det resterende frie kuglemølle-volumen. Disintegrationsbehandling blev udført ved at køre møllen 5 gange i 1 minut ved intervaller på 30 sekunder, idet isvand blev
- 30 holdt i kølekappen for at sikre, at disintegrationsbehandlingens temperatur blev holdt under 20°C. Umiddelbart efter disintegrationsbehandlingen blev en del af homogenatet overført til Sarstedt-rør, og gærtørstoffet blev bestemt som beskrevet ovenfor, men uden centrifugering. En kendt mængde (b g) af homogenatet blev overført til en 10 ml målekolbe, og opløsningsmiddel blev sat til op til 10 ml.
- 35 Absorbans blev målt i denne opløsning.

Det totale pigmentindhold i μg pr. g gærtørstof bestemmes ved:

$$X = \frac{E \times 10 \text{ ml}}{\frac{1\%}{E_{1\text{cm}} \times b \times D}} \times 1.000.000 \quad (1)$$

E = absorption ved λ_{max} i det anvendte opløsningsmiddel i en 1 cm cuvette

$E_{1\text{cm}}$ = Absorbans af 1% (vægt/volumen) opløsning i en 1 cm cuvette

b = g ekstrakt

D = mg gærtørstof/g ekstrakt

20 Pigmentekstraktion og analyse - metode 2

En forudbestemt mængde af gærkulturen (a ml) blev overført til Sarstedt-rør og centrifugeret i 5 minutter ved 10.000 x g. Gærcellerne blev vasket i demineraliseret vand og suspenderet i ca. 20 ml methanol. Til en glaskuglemølle af typen

25 Bead Beater (Biospec Products Inc., U.S.A.), i hvilken rotoren var dækket med glaskugler med en diameter på 0,4 mm (ca. 15 g glaskugler), blev methanolsuspensionen tilsat til opfyldning af de resterende frie kuglemølle volumener. Disintegrationsbehandling blev udført ved at køre møllen 5 gange i 1 minut med intervaller på 30 sekunder, idet isvand blev holdt i kølekappen for at sikre, at disintegrationsbehandlingens temperatur blev holdt under 20°C. Umiddelbart efter disintegrationsbehandlingen blev væsken overført til en 50 ml målekolbe. Glaskuglerne vaskes i møllen med 4 x 8 ml methanol. Fraktionerne opsamles og blandes, og methanol sættes til op til 50 ml. Methanolekstrakten filtreres før pigmentanalyse. Gærtørstoffet i kulturen bestemmes som beskrevet ovenfor.

Det totale pigmentindhold pr. ml prøve bestemmes ved:

$$X' = \frac{E \times 50 \text{ ml}}{\frac{1\%}{E_{1\text{cm}}} \times a} \times 10.000 \quad (2)$$

X' = $\mu\text{g pigment/ml prøve}$

a = volume prøve i ml

E = absorbtion af λ_{max} i det anvendte opløsningsmiddel i en 1 cm cuvette

$\frac{1\%}{E_{1\text{cm}}}$ = absorbans af 1% (vægt/volumen) opløsning i en 1 cm cuvette

Det totale pigmentindhold pr. g gærtørstof bestemmes ved

$$Y = \frac{X'}{\text{YDMC}} \times 1.000 \quad (2a)$$

Y = $\mu\text{g pigment/g gærtørstof}$

YDMC = g gærtørstof/l dyrkningsvæske

HPLC-analyse til astaxanthinbestemmelse - metode 1

HPLC-data:

Udstyr:

Søjler: LKB Ultropac Precolumn, Lichrosorb RP 18 7 μm

4x30 mm,

LKB Ultropac Column, Lichrosorb RP 18 5 μ m 4x250 mm

5 Detektor: LKB 2151 variable wavelength monitor (variabel
bølgelængdemonitor)

Integrator: Waters 740 Data Module

10 Controller: LKB 2152 HPLC Controller

Pumper: LKB 2150 HPLC-pumper

Autosampler: LKB 2157 autosampler med variabel loop

15 Manuel injektion: Rheodyn 20 μ l loop

Opløsningsmidler:

20 A: 860 ml acetonitril + 100 ml vand + 40 ml
myresyre

B: 960 ml ethylacetat + 40 ml myresyre

25 Alle opløsningsmidler er af HPLC-kvalitet

Flow: 1,0 ml/min.

Gradienter: 0-100% B 20 minutter, lineær gradient
100-0% B 10 minutter, lineær gradient

30

Detektor: 471 nm

Temperatur: Omgivelsestemperatur

Standardopløsning: 5 mg rent astaxanthin (smeltepunkt 220-222°C, absorbans af 1% volumen/vægt acetoneopløsning i 1 cm cuvette 2100) fra Hoffmann-La Roche (i det følgende betegnet astaxanthinstandarden) udvejes og opløses i 500 ml acetone.

5

Til HPLC-analyse injiceres 20 µl af den pågældende prøve i HPLC-kromatografen.

HPLC-analyse til astaxanthinbestemmelse - metode 2

10 HPLC-data:

Udstyr:

15	Søjler:	Supelco presøjle
		Supelco LC 18 - DB, partikelstørrelse 5 µ
		Søjledimensioner 4,6 x 250 cm
20	Detektor:	LKB 2151 variable wavelength monitor (variabel bølgelængdemonitor)
	Integrator:	Waters 740 Data Module
	Controller:	LKB 2152 HPLC Controller
25	Pumper:	LKB 2150 HPLC-pumper
	Autosampler:	LKB 2157 autosampler med variabel loop
30	Manuel injektion:	Rheodyn 20 µl loop
	Opløsningsmidler:	A: 400 ml tetrahydrofuran
		400 ml methanol
35		200 ml 0,02 M glycinbuffer pH = 2,6
		B: 1000 ml tetrahydrofuran

Alle opløsningsmidler undtagen bufferen er af HPLC-kvalitet. Bufferen sterilfiltreres gennem et 0,22 µm filter før anvendelse

5 Detektor: 480 nm

Temperatur: Stuetemperatur

Gradienter og flow

10

	Opløsnings- middel	%	Tid min.	Flow ml/min.
	B	0	0-11	1.0
15	B	0-90	11-21	1.0
	B	90	21-29	1.5
	B	90-50	29-31	1.5
	B	50	31-32	1.0
	B	50-0	32-35	1.0
20	B	0	35-39	1.0

Standardopløsning: 5 mg astaxanthinstandard udvejes og opløses i 500 ml tetrahydrofuran.

25

Til HPLC-analysen injiceres 20 µl af den pågældende prøve i HPLC-kromatografen.

Sarstedt-rør

30 Polypropylencentrifugerør udstyret med en polypropylenprop af typen 55533 fra Hounisens Laboratorium, Århus, Danmark.

Kemikalier

35 Kemikalier anvendt i laboratorieskala var af analytisk kvalitet.

Kemikalier anvendt i fermenteringer var af næringsmiddelkvalitet.

Glucose- og saccharosekoncentrationerne blev analyseret under anvendelse af kits (Best.nr. 139041) fra Boehringer Mannheim.

5

Medium til rystekolbedyrkning og agarplader

YM (Yeast Morphology) medium fra Difco Laboratories Incorporated (Difco Manual: Dehydrated culture media and reagents for microbiology, 10th edition, Detroit, 10 1984).

Cryohætteglas

Polypropylenrør med et volumen på 2,0 ml af typen 363401 fra Tecnunc, 15 Roskilde, Danmark.

EKSEMPEL 1

Mutagenisering

20

I hvert tilfælde blev mutageniseringsbehandlingen udført til opnåelse af en overlevelsesgrad på 1-5% i den behandlede kultur. Egnede mutanter blev selekteret ved visuelt at sammenligne intensiteten af den røde farve fra mutanterne, når de var udpladet som enkeltkolonier på agarplader.

25

UV-bestråling

En netop uklar 4 dage gammel kultur af ATCC 24261, der var dyrket i YM-medium ved 20-22°C blev fortyndet i en 0.9% NaCl-opløsning til koncen- 30 trationer på henholdsvis 10^{-1} , $10^{-1.5}$, 10^{-2} , $10^{-2.5}$ og 10^{-3} , og 0,3 ml af hver af disse fortyndinger blev udpladet på agarplader, således at der blev opnået agarplader med 100-300 kolonier. Pladerne blev derefter underkastet ultraviolet bestråling ved 254 nm i 30 sekunder i en afstand på 20 cm fra bestrålingskilden (Vilbert Lourmat VL 30 LC) og derefter dyrket ved 20-22°C i 10 dage, hvorefter de resulterende 35 koloniers farve blev sammenlignet.

EMS (Ethyl-Methan-Sulphonat) behandling

- 2x15 ml af en 4 dage gammel kultur af ATCC 24261, der var dyrket i YM-medium
5 på et rystebord ved en temperatur på 20-22°C, blev centrifugeret i 15 minutter ved
1250 x g i en MSE Major-centrifuge, og pelleten blev suspenderet i 2x15 ml steril
0,9% NaCl-opløsning i 200 ml centrifugeringsrør. En af cellesuspensionerne blev
anvendt som kontrol. Der blev sat 1 g EMS (Serva 28755) til de andre cellesus-
pensioner. Efter behandling i 30 minutter ved 20°C blev 150 ml kold, steril 0,9%
10 NaCl-opløsning sat til. Gærcellerne blev vasket to gange i sterilt 0,9% NaCl og
suspenderet i 0,9% NaCl. Gærcellesuspensionen blev derefter fortyndet og
udpladet på agarplader på samme måde som beskrevet ovenfor i forbindelse med
UV-behandling. En af de isolerede mutanter blev deponeret hos CBS (Centraal-
bureau voor Schimmelcultures) den 6. april 1987 under deponeringsnr. 224-87.
15 (Stammen er ikke omfattet af krav 1)

Behandling med N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin

- Ca. 25 mg N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (Aldrich Chemie BDR) blev sat til et
20 10 ml tareret måleglas, der var forsynet med glasprop. Vand blev tilsat op til et
samlet volumen på 10 ml, og N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidinen blev opløst
deri ved omrystning. Der blev opnået 10 x 1 ml stamopløsning fra denne opløs-
ning.
- 25 2x20 ml af en 4 dage gammel kultur af CBS 224-87 (den mutant, der blev opnået
ved den ovennævnte EMS-behandling), der var dyrket i YM-medium på et ryste-
bord ved 20-22°C, blev overført til Sarstedt-rør og underkastet 2 gange centrifu-
gering. Pelleten blev suspenderet i 1,5 ml 0,9% steril NaCl-opløsning, og 1 ml af
den ovenfor fremstillede stamopløsning blev tilsat. Efter inkubering i 1 time ved
30 20-22°C blev gærcellerne vasket 5 gange i 10 ml kold, steril 0,9% NaCl-opløsning,
hvorved N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidinen blev fjernet. Gærcellerne blev
derefter fortyndet og udpladet på agarplader på samme måde som beskrevet
ovenfor for UV-behandling. En af de isolerede mutanter blev deponeret hos CBS
den 6. april 1987 under deponeringsnr. 225-87.

Reisolering

CBS 225-87 er blevet isoleret som følger. Fra et frysetørret glas suspenderes gærceller i YM-medium og inkuberes i 5 dage ved 20-22°C. Kulturen udplades på 5 YM-plader og inkuberes i 10 dage ved 20-22°C, og nye kolonier isoleres. En af kolonierne blev deponeret hos CBS den 23. marts 1988 under deponeringsnr. 215-88.

EKSEMPEL 2

10

Bestemmelse af astaxanthinindholdet i vildtype Phaffia rhodozyma-stammer og i mutanter fremstillet i eksempel 1

Den gærcelledyrkning og den astaxanthinbestemmelse, der er beskrevet i dette 15 eksempel, udgør på den ene side de betingelser, hvorunder gærcellerne dyrkes, og på den anden side de betingelser, hvorunder astaxanthin bestemmes i ansøgerens ovennævnte standardmetode til bestemmelse af en gærstammes iboende astaxanthinproducerende evne. Disse er de samme standardbetingelser som de, der er nævnt i kravene.

20

Rystekolbedyrkning

100 µl af en 4 dage gammel kultur af ATCC 24261, der var dyrket i YM-medium på 25 et rystebord på 20-22°C, blev inokuleret i 50 ml YM-medium indeholdt i en 500 ml rystekolbe med 2 prelleplader. Kulturen blev dyrket på et rystebord med omrystning i cirkelbevægelse med 150 omdr. pr. minut i 5 dage ved 20-22°C og en oxygenoverførselshastighed på 30 mmol/l/time, hvorved gærcellekulturen nåede en densitet på 0,6%.

30

Pigmentanalyse

Astaxanthinindholdet i ekstrakten blev identificeret ved de følgende tre metoder.

1. En acetone-, methanol- og ethanolekstrakt, som alle var blevet fremstillet som beskrevet for methanolekstraktfremstillingen ovenfor, blev underkastet spektrofotometrisk scanning, og de $\lambda_{\max}$ -værdier, der er anført i Tabel 1, blev opnået.
- 5 2. Til en halvdel af en 10 ml ethanolekstrakt, der var fremstillet på samme måde som ovenfor, blev sat ca. 50 mg kaliumborhydrid for at reducere astaxanthinet, og blandingen blev omrørt i 30 minutter. Absorptionerne af ekstrakten og af den kaliumborhydridbehandlede prøve blev målt ved varierende bølgelængder på spektrofotometeret. Det fri astaxanthin viste en bred top ved 480 nm, og det
- 10 reducerede astaxanthin viste to toppe ved 450 og 476 nm, hvilket svarer til de værdier, der er anført i litteraturen.
3. Retentionstiden for de astaxanthinholdige ekstrakter ved HPLC under standardbetingelser som defineret ovenfor blev sammenlignet med retentionstiden for den
- 15 ovenfor definerede standardopløsning, dvs. toppene af den astaxanthinholdige prøve ifølge opfindelsen, der var opnået ved HPLC under standardbetingelser, blev sammenlignet med toppene af standardopløsningen opnået ved HPLC. Retentionstiderne viste sig at være identiske.
- 20 Mutantstammen ifølge opfindelsen (CBS 225-87) såvel som de kendte deponerede astaxanthinproducerende *P. rhodozyma*-stammer blev dyrket og analyseret på samme måde som beskrevet ovenfor. Stammernes totale pigmentindhold og astaxanthinindhold er anført i Tabel 2 nedenfor.
- 25 Totalpigmentanalyse blev udført ifølge metoden: Pigmentekstraktion og analyse - metode 1. Astaxanthin blev analyseret ved HPLC-analyse til astaxanthinbestemmelse - metode 1.

TABEL 2

	Stamme	μg af total pigment/g af gærtør- stof	μg af astaxan- thin/g af gærtør- stof
5			
	CBS 5905 = ATCC 24202 = UCD 67-210	332	254
	CBS 5908 = ATCC 24203 = UCD 67-383	318	252
	CBS 6938	303	204
10	CBS 6954	< 50	<100
	ATCC 24201 = UCD 67-203	229	143
	ATCC 24203 = UCD 67-383	338	164
	ATCC 24228 = UCD 68-653C	254	107
	ATCC 24229 = UCD 67-202	287	142
	ATCC 24230 = UCD 67-385	247	132
15	ATCC 24261 = UCD 67-484	449	286
	CBS 224-87	885	570
	CBS 225-87 (stamme ifølge opfindelsen)	1176	706

De anførte værdier er middelværdi af 4 uafhængige målinger. Det skal bemærkes,
 20 at mutantstammerne ifølge opfindelsen udviser et betragteligt forøget astaxanthin-
 indhold.

EKSEMPEL 3 (REFERENCE)

25 Fermentering

Fermenteringerne blev udført som fed-batch-fermenteringer under kulhydratbe-
 grænsning i omhyggeligt vaskede og steriliserede 4 m³ fermentorer af typen Bubble
 Column med et stationært beluftningssystem, der består af perforerede luftrør.
 30 Fermentorerne blev udstyret med pH-elektroder, indløb for pH-regulerende midler
 og skumdæpende midler, og alkoholdetektorer til måling af alkohol i udgangs-
 luften. Fermentorernes kapper var termostaterede.

Udgangsurten havde følgende sammensætning: 20 g/l melasse, 0,6 g/l diammo-
 35 niumsulfat, 0,8 g/l diammoniumhydrogenphosphat og 0,125 g/l magnesium-

sulphat, som alt sammen blev kogt op i en fermentor i 30 minutter sammen med en passende mængde vand (30 l i propageringsfermentoren på 100 l og 2000 l i produktionsfermentoren på 4 m³), før den pågældende fermentor blev inokuleret. Det medium, som blev ført til fermentoren i fed-batch-fermenteringen, kom fra to
5 forskellige beholdninger, dvs. en kemikaliebeholdning, der indeholdt 10 kg diammoniumsulphat, 5,6 kg diammoniumhydrogenphosphat og 80 l vand; og en melassebeholdning, der indeholdt 450 kg melasse og 1000 l vand, som var blevet autoklaveret. 0,1 mg desthiobiotin og 1,6 kg magnesiumsulphat blev ført direkte til fermentoren, før resten af mediet blev tilsat. Alle kemikalierne var af levnedsmid-
10 delkvalitet. Melassen var sukkerroemelasse fra De Danske Sukkerfabrikker.

Beluftningen under fermenteringen var 8,4 m³ pr. minut. Contraspum 210 (Zschimmer & Schwartz) blev anvendt som skumdæmpende middel, og som pH-regulerende middel blev der anvendt svovlsyre.

15 Gærceller af stammen ATCC 24261 blev propageret ved at blive overført fra en skråagar til et reagensglas med en diameter på 2 cm og indeholdende 5 ml YM-medium, i hvilket cellerne blev dyrket i 4 dage på et rystebord under tilstrækkelig beluftning ved en temperatur på 20-22°C, hvorefter kulturen blev overført til 2 l-
20 Erlenmeyerkolber indeholdende 1 l YM-medium. Efter inkubering i 3 dage på et rystebord og under tilstrækkelig beluftning ved en temperatur på 20-22°C blev 1 l af kulturen overført til en 100 l-fermentor indeholdende 30 l starturt. Kulturen blev underkastet batch-dyrkning ved 20-22°C, indtil der var opnået et gærtørstofindhold på 1 g/l. Derefter blev næringsstofftilsætningen igangsæt, og fed-batch-
25 fermenteringen blev udført ved 20-22°C. Efter 2 dages vækst blev 30 l af kulturen overført under sterile betingelser ved hjælp af en peristaltisk pumpe til 4 m³-fermentoren, som indeholdt 200 l starturt. Kulturen blev underkastet batchdyrkning ved 20-22°C, indtil der var opnået et gærtørstof på 1 g/l i kulturen. Derefter blev melassetilsætningen igangsæt og fortsat i 38 timer, hvorefter melassebehold-
30 ningen var udtømt. Kemikalierne blev tilsat proportionalt med melassen i løbet af de første 24 timer. Fed-batch-fermenteringen blev udført ved en temperatur på 20-22°C. Melassemængden i melassebeholdningen blev tilpasset, således at der ikke kunne opnås et gærtørstofindhold på mere end ca. 4% i den fermenterede urt.

Melassetilsætningen til fermentoren under fed-batch-fermenteringen blev tilpasset med det mål at nå en specifik væksthastighed for gærcellerne på $\mu = 0,15 \text{ time}^{-1}$ og blev yderligere reguleret efter ethanolconcentrationen i urten, som bør være mindre end 0,1 volumen%. Ethanolconcentrationen blev således ofte målt, og når
5 det viste sig, at den var for høj, blev melassetilsætningshastigheden nedsat, indtil der igen var opnået et acceptabelt ethanolindhold.

Beluftningen af den fermenterede urt blev fortsat i 16 timer ved 20-22°C uden nogen næringsstofftilsætning.

10

Gærcellernes sammensætning såvel som deres totale pigmentindhold og astaxanthinindhold blev målt til tiden 0, dvs. lige før næringsstofftilsætningen til 4 m³-fermentoren blev igangsat, efter 38 timer, hvor fermenteringen og væksten var afsluttet, og efter 16 timers beluftning af den fermenterede urt. Det totale pig-
15 mentindhold og astaxanthinindholdet blev bestemt som beskrevet i eksempel 2, og sammensætningen af gærcellerne blev bestemt ved konventionelle teknikker. Det totale indhold af nitrogen blev således bestemt ved Kjeldahl-analyse, trehaloseindholdet blev bestemt som beskrevet i *Journ. Am. Chem. Soc.* 72, 1950, p. 2059, og phosphorsyreindholdet blev bestemt som beskrevet i *Water and Wastewater*,
20 American Public Health Association, Inc. p. 199 (1960). Ethanolanalyse blev udført ved Boidins metode til bestemmelse af små mængder alkohol (jfr. *Annal. de la brasserie et de la distillerie*, 1924-25, p. 177). Resultaterne er anført i Tabel 3 nedenfor.

25 Totalpigmentanalyse blev udført efter metode 1. Astaxanthinanalyse ved HPLC blev udført efter metode 1.

30

35

TABEL 3

Fed-batch-fermentering af ATCC 24261

5	Timer	0	18	24	31	38	45	54
	μg total pigment/g gærtørstofindhold	-	181	218	284	415	471	579
	μg astaxanthin/g gærtørstofindhold	-	110	-	-	230	300	350
10	% w/w gærtørstofindhold	0,08	0,48	0,95	2,75	3,06	3,15	3,29
	% v/v ethanol	-	0,00	0,00	0,00	0,10	0,00	0,00
	pH	4,7	4,4	4,0	4,0	4,5	7,8	8,5
15	% w/w N i gærtørstofindhold	-	-	-	-	6,2	6,1	5,7
	% w/w P_2O_5 i gærtørstofindhold	-	-	-	-	2,7	2,6	2,4
	% w/w trehalose i gærtørstofindhold	-	-	-	-	2,6	4,4	11,4

20

EKSEMPEL 4 (REFERENCE)

På en lignende måde, som det der er beskrevet i eksempel 3, blev fed-batch-fermenteringer med stamme ATCC 24261 udført, idet den eneste forskel var, at

25 starturtvolumenet var 1000 l, inokulum i 4 m³-fermentoren var 6 x 1 l ATCC 24261, som var blevet propageret som anført ovenfor, og kemikaliebeholdningen bestod af 0,5 kg diammoniumsulphat, 2,8 kg diammoniumhydrogenphosphat og 80 l vand, og melassebeholdningen bestod af 250 kg melasse og 1000 l vand. Under fed-batch-fermenteringen blev næringsstofferne ført til fermentoren i de første

30 65 timer, hvorefter næringsstoftilsætningen blev standset, og kulturen blev underkastet beluftning i 72 timer.

Resultaterne er anført i Tabel 4 nedenfor.

35

TABEL 4

Fed-batch-fermentering af ATCC 24261

5	Timer	0	65	137
	μg total pigment/g gærtørstofindhold	149	379	561
	μg astaxanthin/g gærtørstofindhold	89	231	369
10	% w/w gærtørstofindhold	0,05	3,5	3,75
	% v/v ethanol	-	0,0	-
	pH	4,5	7,8	9,1
	% w/w N i gærtørstofindhold	-	4,1	4,5
15	% w/w P_2O_5 i gærtørstofindhold	-	1,9	2,2
	% w/w trehalose i gærtør- stofindhold	2,6	13,2	12,8

20 EKSEMPEL 5

Forsøg med mutantstammen CBS 225-87 ifølge opfindelsen blev udført på samme måde som beskrevet i eksempel 4 med et starturtvolumen på 1000 l, hvor inokulum var 6 x 1 l CBS 225-87, som var blevet propageret ved den frem-

25 gangsmåde, der er beskrevet i eksempel 3, og med en kemikaliebeholdning bestående af 5 kg diammoniumsulphat, 2,8 kg diammoniumhydrogenphosphat og 80 l vand. Der blev ikke dannet nogen alkohol under fed-batch-fermenteringen, og næringsstofferne blev tilsat mellem time 0 og 57, hvorefter kulturen blev under-

30 kastet beluftning uden næringsstoftilsætning. Gærcellesammensætningen ved time 80 var 6,5% nitrogen i gærtørstof, 2,5% phosphorpentoxid i gærtørstof og 6,6% trehalose i gærtørstof. Det totale pigment, astaxanthinet og gærtørstofindholdet blev bestemt under fed-batch-fermenteringen, hvilket gav de værdier, der er anført i Tabel 5 nedenfor:

TABEL 5

Fed-batch-fermentering af CBS 225-87

5	Timer	Gærtørstof- indhold g/l	Total pigment		Astaxanthin	
			i prøve µg/ml	i gær µg/g	i prøve µg/ml	i gær µg/g
10	0	1,4	0,9	640		
	22	11,2	8,1	720		
	33	18,4	12,5	680		
	37	20,0	15,6	780	11,0	550
	40	20,8	16,5	790	8,8	420
15	57	23,8	24,0	1010	16,2	680
	61	24,7	24,1	980	17,0	690
	64	24,3	25,5	1050	17,3	710
	80	24,6	36,6	1490	23,6	960

20

Det totale pigment- og astaxanthinindhold i µg/ml er blevet beregnet ud fra det analyserede gærtørstofindhold og µg/g-værdier af totalpigment og astaxanthin.

EKSEMPEL 6

25

Pigment- og astaxanthinindholdet af CBS 215-88 og *P. rhodozyma*-mutantstammer DBT 406 og DBT 403, vildtypestammerne CBS 5905 og ATCC 24261 blev bestemt. Mutantstammerne DBT 406 og DBT 403 er afledt af vildtypestammen ATCC 24230.

30 Rystekolbedyrkning

Fra en skråagar blev gærcellerne inokuleret i YM-medium og inkuberet i 2 dage ved 20-22°C. 1 ml kultur blev inokuleret i 50 ml YM-medium, der var indeholdt i 250 ml rystekolber med 4 prelleplader. Kulturen blev dyrket på et rystebord med cirkelom-
35 rystning ved 150 omdr. pr. minut i 5 dage ved 20-22°C.

Kvantitative bestemmelser af totalpigment blev udført efter metode 2.

Astaxanthinbestemmelse blev udført efter metode 2.

5 Eksempler på beregninger (for CBS 215-88):

Det totale pigmentindhold i methanolekstrakten blev bestemt ved spektrofotometrisk analyse. Absorptionen af 50 ml ekstrakten minus absorptionen af methanol blev målt til $E = 1,189$. Prøvevolumenet var 29 ml. Det totale pigmentindhold i gærekstrakten blev beregnet efter formelen (2) som følger:

$$X' = 1,160 \times 50 / 2100 / 29 \times 10.000 \mu\text{g/ml} = 9,52 \mu\text{g/ml}$$

Gærtørstofindholdet blev bestemt til 6,7 g/l. Det totale pigmentindhold pr. g gærtørstof bestemmes ved formel (2a) som følger:

$$Y = 9,52 / 7,1 \times 1.000 \mu\text{g/g} = 1340 \mu\text{g/g}$$

Astaxanthinkoncentrationen i methanolen blev bestemt ved HPLC-analyse til 6,4 $\mu\text{g/ml}$ svarende til:

$$6,2 \mu\text{g/ml} / 7,1 \text{ g/l} = 880 \mu\text{g astaxanthin} / \text{g gærtørstof}$$

Alle stammer blev dyrket og analyseret på samme måde som beskrevet ovenfor. Stammernes totale pigment- og astaxanthinindhold er anført i Tabel 6.

TABEL 6

5	Stamme	Gærtørstofindhold g/l	Total pigment		Astaxanthin	
			$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/g}$
10	CBS 5905	5,3	1,38	260	0,84	160
	ATCC 24261	5,5	2,10	380	1,38	250
	DBT 406	2,2	5,84	2650	3,4	1540
	DBT 403	1,6	5,04	3150	3,3	2050
	CBS 215-88	7,1	9,52	1340	6,2	880

Det bemærkes, at DBT 406 og DBT 403 har et højt indhold af astaxanthin pr. g
15 gær, men at disse stammer vokser dårligt, hvilket fremgår af gærtørstof-
indholdet/l.

EKSEMPEL 7

20 Fed-batch-fermentering af mutantstammen CBS 215-88 ifølge opfindelsen
blev udført under anvendelse af majsstøbevæsketørstof og saccharose som
kulhydratkilder i den samme 4 m³-fermentor som beskrevet i eksempel 3.
Starturten bestod af:

25	10	kg	majsstøbevæsketørstof
	12	kg	saccharose
	10	kg	diammoniumsulphat
	3	kg	kaliumdihydrogenphosphat
	1	kg	magnesiumsulphat
30	0,05	g	biotin
	300	ml	antiskum Contraspum 210
	1000	l	vand

blev steriliseret ved pH 4,6 ved dampinjektion ved 95°C i en time, og efter afkøling
35 til 22°C blev 6x1 l CBS 215-88, der var propageret som anført ovenfor, tilsat som

inokulum. Efter 35 timers beluftning ($4,2 \text{ m}^3/\text{minut}$) blev tilsætning af saccharoseopløsning ($0,30 \text{ g/l}$) igangsat. Tilsætningshastigheden var $2,3 \text{ l/time}$. Beluftningen blev øget til $8,4 \text{ m}^3 \text{ pr. minut}$, og pH-regulatoren igangsat (setpunkt $4,0$). Når saccharosekoncentrationen i mediet blev reduceret til ca. 1 g/l efter 28 timer, blev saccharosetilsætningen øget til $7,3 \text{ l pr. time}$ og holdt ved denne hastighed i 24 timer. Herefter blev saccharosetilsætningen standset, og beluftningshastigheden blev reduceret til $4,2 \text{ m}^3 \text{ pr. minut}$ og fortsat i 72 timer. Det totale pigment og astaxanthin blev bestemt under fed-batch-fermenteringen, hvilket gav de værdier, der er anført i Tabel 7.

10

TABEL 7

Fed-batch-fermentering af CBS 215-88

15

	Timer med sucrosetilførsel	28	52	
	Timer med beluftning efter afslutning af sucrosetilførsel			6
20	$\mu\text{g total pigment/ml kulturmedium}$	14,1	37,7	43,4
25	$\mu\text{g astaxanthin/ml kulturmedium}$	-	23,4	29,9
	pH	4,0	4,0	4,0
	% w/w N i gærtørstofindhold	-	-	7,69
	% w/w P_2O_5 i gærtørstofindhold	-	-	3,72
30	% w/w trehalose i gærtørstofindhold	-	-	4,4

35

Gærcellerne blev adskilt fra mediet ved hjælp af centrifugering i en De Laval OA5M-centrifuge og vasket med vand 2 gange. Gærcellerne blev separeret fra gærfløden ved hjælp af filtrering i et FILTROX-filter, type VARIOX 40/40 cm, og filterkagen med 26,3% tørstof blev ekstruderet gennem en 1 mm si i en laboratorie
5 fluid bed-tørrer (GLATT, Haltingen-Binzen Bd.) og tørret ved 30°C i 90 minutter. Den tørrede gær (91,6% tørstof) indeholdt

1360 µg total pigment/g gærtørstofindhold

10 1080 µg astaxanthin/ gærtørstofindhold

EKSEMPEL 8

Downstream processing

15

Gærceller, der var opnået ved metoden ifølge eksempel 3, blev isoleret fra den fermenterede urt ved centrifugering i en De Laval OA5M-centrifuge. Cellerne blev vasket to gange med vand, og der blev opnået en gærfløde med 13% gærtørstof. pH-værdien af gærfløden blev indstillet til 4,0 ved tilsætning af svovlsyre, og

20 natriumbenzoat blev tilsat til en koncentration på 0,2% (vægt/volumen) i gærfløden. Under behandlingen blev de isolerede gærceller holdt i en nitrogen atmosfære for således at undgå væsentlig oxidation af astaxanthinet i gærcellerne, og temperaturen blev holdt på ca. 10°C.

25 Gærfløden blev sendt tre gange gennem et system bestående af en APV-Gaulin MC4-homogenisator udstyret med en celleødelæggelsesventil og en varmeveksler, hvor gærfløden blev underkastet disintegration ved et tryk på 700 bar, hvorved temperaturen øgedes med 10-15°C, og efterfølgende afkøling i varmeveksleren til opnåelse af en temperatur på 15°C. Gærfløden blev cirkuleret i systemet med en
30 hastighed på 250 l pr. time.

De disintegrerede cellers astaxanthinindhold blev bestemt som følger:

0,5 ml homogeniseret gærfløde blev udvejet og overført til et Sarstedt-rør og rystet med 5 ml acetone. Prøven blev centrifugeret, overført til en 10 ml målekolbe

35 og vasket tre gange med acetone med mellemliggende centrifugeringer og

kvantitative overførsler. Det totale pigmentindhold blev bestemt ved metode 1, og astaxanthinindholdet blev bestemt ved HPLC-metode 1, og indholdet blev relateret til det totale tørstofindhold i prøven, som var bestemt ved den metode, der er forklaret i afsnittet om materialer og metoder ovenfor. Ved at sammenligne det

5 ekstrakterbare astaxanthinindhold i gærfløden homogeniseret som beskrevet i dette eksempel med indholdet i gærfløden bestemt ved metode 1, hvor cellerne blev fuldstændigt disintegreret, blev disintegrationsgraden ved nærværende eksempel bestemt til at udgøre mere end 90% af de totale celler.

- 10 Til de således disintegrerede celler, hvilke celler blev holdt i nitrogen atmosfære, blev 7% natriumcaseinat tilsat ved en temperatur på ca. 45°C under omrøring. Gærcellehomogenatet i blanding med natriumcaseinat blev derefter underkastet spraytørring i et spraytårn af typen Anhydro, hvori indgangstemperaturen var 180°C. Gærcellemassen blev atomiseret under anvendelse af et sprayhjul, og
- 15 temperaturen af den udgående luft fra spraytårnet havde en temperatur på ca. 90°C. Det resulterende gærpulver blev opsamlet under anvendelse af en cyklon. Vandindholdet i gærpulveret var mindre end 10 vægt%.

EKSEMPEL 9

20

Ekstraktion af totalpigment med iseddikesyre

- 20 g ikke-ødelagte *Phaffia rhodozyma*-gærceller (som var blevet filtreret og efterfølgende ekstruderet i en fluid bed, hvor de var blevet tørret) med et
- 25 tørstofindhold på 95% og indeholdende 523 µg astaxanthin pr. g gærtørstof blev introduceret i en søjle med en længde på 12 cm og en indre diameter på 2,4 cm. Søjlen blev udstyret med en kappe, hvori vand med en temperatur på 75°C blev cirkuleret. Ved søjlens bund var der anbragt en lille mængde syrevasket sand (et sandfilter) på et bomulds-lag. Gærcellerne blev ekstraheret med 5 x 100 ml ised-
- 30 dikesyre ved en temperatur på 75°C, og astaxanthinmængden i hver af ekstrakterne såvel som i det ekstraherede gærcellemateriale (omfattende ca. 100 ml iseddikesyre, der var tilbage i søjlen), blev bestemt. Det ekstraherede gærcellemateriale var blevet inddampet til tørhed (resulterende i 16,16 g materiale) før astaxanthinbestemmelsen blev udført. Resultaterne er anført i Tabel 8 nedenfor.

35

TABEL 8

5	Total astaxanthin-indhold i gærceller før ekstraktion		
	20 g x 523 µg/g	10460 µg	
Astaxanthinindhold i			
10	1. ekstrakt	100 ml x 55,7 µg/ml	5570 µg
	2. ekstrakt	100 ml x 14,6 µg/ml	1460 µg
	3. ekstrakt	100 ml x 4,4 µg/ml	440 µg
	4. ekstrakt	100 ml x 3,1 µg/ml	310 µg
15	Total astaxanthin-indhold i ekstrakter		7780 µg
	Astaxanthinindhold i ekstraheret tør-gærstofmateriale		
20	16,16 g x 22,5 µg/g	363,6 µg	
	Total astaxanthin-indhold frigivet fra gærceller ved ekstraktionen		
25			8143,6 µg

77,9% ($8143,6/10460 \times 100\%$) af gærcellernes astaxanthinindhold blev således frigivet ved ekstraktionen.

30 EKSEMPEL 10

Ødelæggelse af gærceller ved homogenisering i en kuglemølle

Phaffia rhodozyma-gærceller, som var blevet tørret i en fluid bed, og som indeholdt 35 336 µg astaxanthin/g gærtørstof, blev suspenderet i soyabønneolie i en koncentra-

tion på 40 vægt%. Suspensionen blev pumpet til en kuglemølle (CoBall®-mølle type MSZ-12) indeholdende zirkonium-kugler (0,1-1,5 mm) og med et kugleindhold på 70-75%. Rotorens slag var 13 m pr. sekund. Der er blevet taget prøver efter hver kørsel, og astaxanthinindholdet af prøverne blev analyseret på HPLC. Temperaturen i kuglemøllen blev holdt på 40-50°C.

På lignende måde blev en suspension af de ovenfor tørrede gærceller i 75% vand tørret i en kuglemølle. Ved denne behandling var rotorens hastighed 15 m pr. sekund.

10

Resultaterne er anført i Tabel 9, hvor astaxanthinindholdet er anført som µg/g gærtørstof

TABEL 9

15

60% soyabønneolie 75% vand

	Første kørsel	221	179
20	Anden kørsel	308	192
	Tredie kørsel	313	276

Til sammenligning blev der kun opnået 23 µg astaxanthin pr. g gærtørstof, når den tørrede gær blev behandlet med soyabønneolie eller vand uden samtidig homogenisering.

Ved forsøget er det vist, at ca. 3 kørsler i kuglemøllen er tilstrækkelige til opnåelse af en i det væsentlige total ødelæggelse af gærcellen.

30

35

EKSEMPEL 11

Fodring af fisk

- 5 Fiskefoder med varierende astaxanthinindhold blev fremstillet. Fiskefoderet blev fremstillet ud fra kommercielt fiskefoder Ecoline 16 fra Dansk Ørredfoder, Brande, Danmark, hvilket er en blanding af fiskemel, sojamel, fiskeolie, ekstruderet hvede, lecitin og vitaminer i form af en premix. Forskellige mængder astaxanthin blev tilsat dette foder. Astaxanthinet var opnået fra *P. rhodozyma*-gærceller, som var
- 10 blevet dyrket på samme måde som beskrevet i eksempel 3, og som var blevet spraytørret. De spraytørrede gærceller blev fremstillet fra 28 kg homogeniseret gærfløde, som var blevet blandet med 0,475 kg natriumcaseinat opløst i 2,7 kg vand ved ca. 50°C. 0,068 kg GRINDTEK MOR 50 indeholdende 2 g ascorbylpalmitat og 1 g tocopheroler fra soyabønner blev emulgeret i natriumcaseinatopløsningen.
- 15 Natriumcaseinatopløsningen (indeholdende antioxidanter) blev blandet med den homogeniserede gærfløde, og blandingen blev spraytørret som beskrevet i eksempel 8. Det spraytørrede produkt (92,6% tørstof) indeholdt ca. 674 µg astaxanthin pr. g gærtørstof. Det spraytørrede produkt blev sat til det kommercielle fiskefoder, således at der blev opnået de varierende astaxanthinkoncentra-
- 20 tioner i fiskefoderet (foder A-D), som ses i Tabel 10 nedenfor.

Et fiskefoder indeholdende syntetisk astaxanthin (foder E) blev anvendt som kontrol. Foderet E indeholdt astaxanthin i en mængde svarende til 40 ppm.

- 25 Foder A-E har følgende sammensætning:

30

35

TABEL 10

Fiskefoder

5						
		A	B	C	D	E
	Astaxanthin $\mu\text{g/g}$ foder	4,4	12,8	20,4	39,2	-
	Syntetisk astaxanthin	-	-	-	-	40
	Tørt indhold %	91,94	91,49	91,56	91,88	88,81
10	Aske %	9,12	9,00	8,79	8,45	7,03
	Cellulose %	1,46	1,45	1,60	2,05	1,71
	Protein %	43,62	43,20	43,86	43,81	43,15
	Fedt %	17,59	17,21	18,62	20,00	21,19
	Phosphor g/kg	11,58	10,89	11,25	10,80	9,96
15	Nitrogenfrit ekstrakt %	20,15	20,53	18,69	17,57	15,73

Ca. 60 regnbueørreder, der hver vejede ca. 400 g, blev anvendt i disse forsøg med hver af fiskefodertyperne A-E. Fisken blev holdt i bure og fodret ad libitum. Vandet
 20 havde en temperatur i området 2,5-14°C, hvor de lavere temperaturer var i sidste del af fiskefodringseksperimentet.

Ekstraktion af astaxanthin fra fisk

25 Det anvendte udstyr er det udstyr, der normalt anvendes i laboratorieforsøg.

En regnbueørred uden skind blev skåret i stykker, og 15 g kød blev udvejet i et centrifugerør (100 ml). 15 ml tetrahydrofuran blev sat til som ekstraktionsmiddel. Kødet blev yderligere findelt i en ULTRATURAX-mixer og efterfølgende centrifu-
 30 geret. Tetrahydrofuranektrakten blev overført til en 50 ml målekolbe. Remanensen blev vasket med 10 ml tetrahydrofuran i 2-3 minutter på et sonikeringsbad og centrifugeret, og tetrahydrofuranfasen blev overført til målekolben, til hvilken yderligere tetrahydrofuran blev sat til op til 50 ml. 10 ml ud af de 50 ml blev inddampet under nitrogenatmosfære ved en temperatur på 40°C. Afdampnings-

resten blev genopløst i 1 ml mobil fase og filtreret gennem et 0,45 µm-filter før yderligere analyse.

HPLC-analyse

5		
	Søjle	LiChrosorb RP-18, 5 µm, 250 x 4,6 mm
	Mobilfase:	40 ml myresyre
		60 ml vand
		384 ml ethylacetat
10		516 ml acetonitril
	Flow:	10 ml pr. min.
	Injektion:	20 µl loop, Rheodyne 7120
	Pumpe:	Waters 510
	Detektor:	Waters 481, UV-spectrophotometer, 471 nm
15	Integrator:	Waters 740

Bestemmelse af fiskens farve

Farven af fiskekødet blev bestemt ved L*a*b*-farvebestemmelsesmetoden under anvendelse af et Minolta Chroma Meter II. L*-værdien betegner lyskomponenten, a*-værdien (der antager værdier fra -60 til +60) betegner den grøn/røde komponent (de negative værdier betegner den grønne komponent, og de positive værdier betegner den røde komponent), og b*-værdien (der antager værdier fra -60 til +60) betegner farvens blå/gule komponent. Kun a*-værdien er anført i Tabel 11.

25 Regnbueørredkød uden skind blev homogeniseret i en blender til opnåelse af en homogen masse, som blev anbragt i små petriskåle (med en højde på 1 cm og en diameter på 3,5 cm), således at det udfyldte hele dette volumen. Overfladen af massen i petriskålen blev udglattet og dækket med en glasplade og var derefter
30 klar til analyse.

De opnåede data for fiskefodringsforsøget er anført i Tabel 11 nedenfor:

TABEL 11

Analyse af fiskefoderet i 16 dage

	μg asta- xanthin/ g fisk	fiskens vægt (g)	farve af fiske- kød (a*)
Foder A	0,50	380	1,45
	0,60	434	1,12
	0,65	252	0,08
	0,60	580	0,48
	0,65	392	-0,02
Foder B	1,45	343	1,53
	0,15	385	0,05
	0,20	298	-0,52
	1,00	388	0,52
	0,60	317	-0,33
Foder C	0,75	471	0,00
	0,85	290	1,20
	0,45	328	0,23
	0,30	300	-0,38
	0,75	359	-0,38
Foder D	0,70	258	-0,20
	0,45	643	0,72
	1,00	369	2,05
	0,70	450	0,50
	0,30	382	-0,10
Foder E	0,25	374	-0,80
	0,60	339	0,12
	0,80	405	0,98
	0,65	579	0,36
	1,20	534	1,18

TABEL 11 (fortsat)

Analyse af fiskefoderet i 23 dage

	μg asta- xanthin/ g fisk	fiskens vægt (g)	farve af fiske- kød (a*)
Foder A	0,65	668	0,76
	0,60	571	1,00
	0,40	535	0,26
	0,50	469	-0,50
	0,20	386	0,06
Foder B	0,40	348	0,02
	0,40	325	0,16
	0,75	500	1,32
	0,75	355	0,16
	0,50	406	0,18
Foder C	1,25	356	1,25
	1,05	464	1,88
	1,05	317	1,98
	0,25	301	-1,44
	0,50	329	-0,44
Foder D	0,50	287	-0,14
	0,65	380	1,34
	0,45	436	0,62
	1,65	449	3,38
	1,85	409	3,26
Foder E	2,00	487	4,08
	0,50	429	0,82
	0,35	673	2,53
	1,20	441	3,16
	1,15	404	0,90

TABEL 11 (fortsat)

Analyse af fiskefoderet i 30 dage

	μg asta- xanthin/ g fisk	fiskens vægt (g)	farve af fiske- kød (a*)
Foder A	0,80	410	1,12
	0,60	448	0,78
	0,50	409	1,50
	0,55	483	1,40
	0,65	352	0,40
Foder B	0,75	344	0,35
	0,35	410	1,17
	0,45	547	0,40
	0,35	493	2,20
	0,95	228	2,14
Foder C	1,10	517	3,30
	0,95	405	1,48
	1,55	381	2,26
	0,75	330	1,48
	0,95	413	1,80
Foder D	2,15	635	6,10
	0,85	384	1,68
	2,10	363	0,56
	1,70	423	3,70
	1,00	348	1,92
Foder E	1,15	390	1,84
	2,10	427	4,00
	3,00	433	4,14
	0,40	337	0,02
	0,55	342	0,85

TABEL 11 (fortsat)

Analyse af fiskefoderet i 43 dage

	μg asta- xanthin/ g fisk	fiskens vægt (g)	farve af fiske- kød (a*)
Foder A	1,00	429	2,50
	0,60	300	-0,56
	0,90	848	2,32
	0,50	417	0,16
	0,45	385	-0,54
Foder B	0,75	623	1,94
	1,00	352	1,88
	1,00	620	1,44
	0,75	484	1,52
	0,95	441	0,78
Foder C	0,75	604	1,30
	0,90	480	1,84
	1,20	540	2,96
	2,20	444	4,78
	1,35	414	0,74
Foder D	1,45	471	3,66
	2,10	436	6,61
	2,15	508	5,56
	3,00	510	6,04
	1,15	381	1,72
Foder E	1,20	512	2,40
	3,00	452	4,84
	4,30	634	8,04
	1,75	474	4,43
	3,70	517	5,46

TABEL 11 (fortsat)

Analyse af fiskefoderet i 72 dage

	μg asta- xanthin/ g fisk	fiskens vægt (g)	farve af fiske- kød (a^*)
Foder A	0,55	409	1,08
	0,70	628	4,02
	1,95	1177	3,84
	0,70	663	1,42
	1,65	401	1,34
Foder B	1,05	386	2,24
	0,90	666	2,46
	0,30	507	2,46
	2,05	585	4,90
	1,20	518	1,52
Foder C	1,15	701	2,40
	1,80	415	4,42
	4,80	739	9,36
	5,00	451	7,26
	4,00	594	5,48
Foder D	1,15	444	2,32
	2,05	514	6,98
	4,25	493	8,40
	4,80	612	8,24
	4,25	633	6,66
Foder E	3,05	627	6,32
	3,75	618	6,26
	4,65	507	9,78
	5,95	654	8,56

Resultaterne viser, at astaxanthinet i hver af fiskefoderblandingerne A-E er blevet absorberet af fiskene, og at fiskekødet opnår en stigende rød pigmentering med stigende mængder astaxanthin i foderet (foder A-D) og med forøget fodringstid (som observeret ved a^* -værdien (betegnende farvens røde komponent)).

Derudover antyder resultaterne, at nærværelsen af astaxanthin i foderet ikke påvirker fiskenes vækst.

Fiskene blev også bedømt visuelt og viste sig generelt at have en attraktiv rød
5 farve. Efter 43 dages fodring kunne der ikke ses nogen væsentlig forskel i pigmen-
tering af fisk fodret med foder D og E (indeholdende henholdsvis ca. 40 ppm
astaxanthin produceret ifølge opfindelsen og 40 ppm syntetisk astaxanthin). Efter
72 dages fodring kunne der ikke observeres nogen væsentlig forskel i pigmen-
tering af fisk fodret med foder C, D og E (indeholdende henholdsvis ca. 20 ppm
10 astaxanthin produceret ifølge opfindelsen, 40 ppm astaxanthin produceret ifølge
opfindelsen og 40 ppm syntetisk astaxanthin).

PATENTKRAV

15

1. *Phaffia rhodozyma*-gærcele,
som er den gærstamme, der er deponeret under deponeringsnr. 225-87 CBS, eller
den gærstamme, der er deponeret under deponeringsnr. 215-88 CBS, eller en mu-
tant eller et derivat deraf, eller en mutant eller et derivat af den gærstamme, der
20 er deponeret under deponeringsnr. 225-87-CBS, som har bibeholdt den
astaxanthinproducerende evne, og som, når den dyrkes under betingelser, der
omfatter en oxygenoverførselshastighed på mindst 30 mmol pr. l pr. time på Difco
YM-medium ved 20-22°C i 5 dage i 500 ml rystekolber med to prelleplader
indeholdende 50 ml af mediet og underkastet omrystning ved cirkelbevægelse ved
25 150 omdr. pr. minut, idet inokulum er 100 µl af en 4 dage gammel YM-kultur,
producerer astaxanthin i en mængde på mindst 600 µg pr. g gærtørstof bestemt
ved HPLC-analyse under anvendelse af ren astaxanthin som en standard af en
methanolekstrakt af gæren, der er fremstillet ved at underkaste en suspension af
0,2 g gærtørstof i 20 ml methanol 5 x 1 minuts disintegration i intervaller på et
30 halvt minut, idet disintegrationen udføres ved en temperatur på højst 20°C i en
glaskuglemølle indeholdende 15 g glaskugler med en diameter på 0,4 mm, idet
glaskuglemøllen er udstyret med en kølekappe med isvand.

2. Gærcele ifølge krav 1,

k e n d e t e g n e t ved, at den, når den dyrkes under de betingelser, der er anført i krav 1, producerer astaxanthin i en mængde på mindst 700 µg pr. g gærtørstof, fortrinsvis mindst 1000 µg pr. g gærtørstof, især mindst 1500 µg pr. g gærtørstof og i særdeleshed mindst 2000 µg pr. g gærtørstof, som bestemt ved

5 den metode, der er anført i krav 1.

3. Fremgangsmåde til fremstilling af astaxanthinholdige *Phaffia rhodozyma*-celler eller celledele eller astaxanthin,

k e n d e t e g n e t ved, at astaxanthinproducerende *Phaffia rhodozyma*-

10 gærceller, som defineret i krav 1, dyrkes under aerobe betingelser i et medium, der indeholder kulhydratkilder, assimilerbare nitrogen- og phosphorkilder, mikro-næringsstoffer og biotin eller desthiobiotin ved en temperatur i området 15-26°C for således at opnå en biomasse, der indeholder astaxanthin i en mængde på mindst 600 µg pr. g gærtørstof som bestemt ved den metode, der er anført i krav

15 1, og eventuelt at der udføres ét eller flere af de følgende trin i arbitrær rækkefølge:

- Cellerne høstes fra kulturen, således at der opnås en gærfløde,
- cellerne åbnes, for eksempel ved at ødelægge cellevæggene ved hjælp af mekanisk, kemisk og/eller enzymatisk behandling og/eller at cellerne

20 underkastes sonikering, autolyse, osmolyse og/eller plasmolyse, eventuelt med tilsætning af egnede midler såsom detergenter, syrer, baser, enzymer, autolyse-forøgende stoffer, osmolyserende midler, såsom salte, og/eller plasmolyserende midler,

- cellerne homogeniseres til opnåelse af et homogenat,

25 - cellerne, cellefragmenterne eller homogenatet tørres, fortrinsvis til et vandindhold på højst 12 vægt%, fortrinsvis højst 10%

- astaxanthin ekstraheres fra cellerne, cellefragmenterne eller homogenatet.

4. Fremgangsmåde ifølge krav 3,

30 k e n d e t e g n e t ved, at dyrkningen udføres som en fed-batch-fermentering under betingelser, hvor der i det væsentlige ikke dannes alkohol, og eventuelt hvor den totale glukose- og saccharosekoncentration højst er 8 g/l, fortrinsvis 5 g/l, og især 1 g/l, fortrinsvis ved en temperatur på 20-22°C, hvor fermenteringen eller en del deraf udføres i et medium, der omfatter melasse og/eller saccharose og

nitrogenkilder, såsom diammoniumsulfat, ammoniumphosphat, ammoniumhydroxid eller urinstof, phosphorkilder såsom ammoniumphosphat og phosphorsyre og tilsatte mikronæringsstoffer eller mineralsalte såsom magnesiumsulfat, zinksulfat og biotin eller desthiobiotin, idet melassen eventuelt tilføres mediet

5 adskilt fra de andre bestanddele.

5. Fremgangsmåde ifølge krav 3 eller 4,
k e n d e t e g n e t ved, at dyrkningen omfatter en vækstfase under betingelser, som i det væsentlige er tilstrækkelige med hensyn til væsentligt alle vækstbe-

10 tingelser, og en efterfølgende vækstbegrænset fase under betingelser, hvor dyrkningsmediet under fortsat beluftning udtømmes for mindst en vækstfaktor for således at øge produktionen af astaxanthin under den efterfølgende fase, idet den efterfølgende vækstbegrænsede fase fortrinsvis har en varighed på mindst ca. 16 timer, såsom 16-24 timer, idet den efterfølgende vækstbegrænsede fase fortrinsvis

15 er justeret således, at astaxanthinproduktionen øges mindst 1,2 gange den produktion, der opnås uden den efterfølgende fase, fortrinsvis mindst 1,3, såsom 1,4 og især 1,5 gange den produktion, der opnås uden den efterfølgende fase, idet den efterfølgende vækstbegrænsede fase fortrinsvis udføres i det væsentlige uden nogen tilsætning af noget næringsstof eller mikronæringsstof til mediet.

20

6. Fremgangsmåde ifølge krav 5,
k e n d e t e g n e t ved, at astaxanthinkoncentrationen i den opnåede biomasse er mindst 700 µg pr. g gærtørstof, som bestemt ved den fremgangsmåde, der er anført i krav 1.

25

7. Fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af kravene 3-6,
k e n d e t e g n e t ved, at den gærcele, der dyrkes, er en gærcele ifølge krav 1 eller 2, hvor astaxanthinkoncentrationen i den opnåede biomasse er mindst 800, især mindst 1000 µg pr. g gærtørstof, i særdeleshed mindst 1500 µg pr. g gærtør-

30 stof, for eksempel mindst 2000 µg pr. g gærtørstof, og mest foretrukket mindst 3000 µg pr. g gærtørstof som bestemt ved den metode, der er anført i krav 1.

8. Fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af kravene 3-7,
k e n d e t e g n e t ved, at gærcellen efter dyrkningen og eventuelt efter den

35 vækstbegrænsede fase, underkastes én eller flere af følgende behandlinger:

- Ødelæggelse af cellerne ved at udsætte cellerne for et forøget tryk og derefter frigive trykket og efterfølgende at underkaste de ødelagte celler ultrafiltrering eller inddampning for således at koncentrere
5 de ødelagte gærceller,
- ødelæggelse af cellerne ved at udsætte cellerne for et forøget tryk og derefter frigive trykket og efterfølgende spraytørre eller tromletørre de ødelagte celler,
- filtrering til opnåelse af en filterkage, som derefter ekstruderes, hvorefter
10 ekstrudatet tørres, for eksempel i en fluid bed eller ved bakketørring,
- blanding af tørret helcellemateriale, som er blevet tørret i en fluid bed eller ved bakketørring, med en olieagtig fase såsom en spiselig olie eller spiseligt fedtstof, og maling af blandingen i en mølle såsom en kuglerørermølle til ødelæggelse af cellerne og frigivelse af
15 astaxanthin til den olieagtige fase,
- ekstraktion af ødelagte celler, der fortrinsvis er homogeniseret med organiske opløsningsmidler såsom petroleumether, acetone eller en alkohol såsom methanol, ethanol eller isopropanol, til opnåelse af astaxanthin opløst i det organiske opløsningsmiddel og derefter
20 eventuel fjernelse af opløsningsmidlet for eksempel ved afdampning,
- ekstraktion af helceller med et opløsningsmiddel, der omfatter iseddikesyre, til opnåelse af astaxanthin indeholdt i det iseddikesyreholdige opløsningsmiddel,
- superkritisk ekstraktion af ødelagte eller hele, våde eller
25 tørre celler med carbondioxid, eventuelt sammen med organiske opløsningsmidler, for eksempel af den ovennævnte type,

idet behandlingerne fortrinsvis udføres under oxygenbegrænsede betingelser såsom i en inert atmosfære, hvor den inerte atmosfære for eksempel tilvejebringes
30 ved hjælp af vanddamp og/eller ved hjælp af nitrogen og/eller carbondioxid, idet ekstraktionen af de hele gærceller med det iseddikesyreholdige opløsningsmiddel fortrinsvis udføres ved en temperatur over opløsningsmidlets frysepunkt, for eksempel i området 20-100°C, fortrinsvis i området 20-80°C, og især i området 20-60°C.

9. Dyrefoder,

- k e n d e t e g n e t ved, at det omfatter *Phaffia rhodozyma*-gærceller ifølge krav 1 eller gærcelledele indeholdende astaxanthin i en mængde på mindst 600 µg pr. g gærtørstof som bestemt ved den metode, der er anført i krav 1, fx gærceller ifølge
- 5 krav 1 eller 2 eller dele deraf eller gærceller eller gærcelledele fremstillet ved fremgangsmåden ifølge et hvilket som helst af kravene 3-8, sammen med andre foderbestanddele, hvor de astaxanthinholdige gærceller eller gærcelledele udgør
- højst 10 vægt% af det totale tørstof af dyrefodersammensætningen, fortrinsvis højst 5% og især højst 3%, idet de andre komponenter fortrinsvis er valgt fra
- 10 protein- og kulhydratkilder såsom fiskemel, valle, blodmel, vegetabilsk mel, fedtstoffer såsom fiskeolie og vegetabiliske olier, vitaminer og mineraler.

10. Fremgangsmåde til fodring af dyr til opnåelse af en rødlig pigmentering af deres kød og/eller af produkter fremstillet af dyrene,

- 15 k e n d e t e g n e t ved, at der til dyrene administreres et foder, der indeholder *Phaffia rhodozyma*-gærceller ifølge krav 1 eller celledele, der indeholder astaxanthin, i en mængde på mindst 600 µg pr. g gærtørstof, som bestemmes ved den metode, der er anført i krav 1, idet dyrene fortrinsvis er fisk, især laks eller havørred, kører til farvning af deres smør eller fjerkræ til farvning af deres
- 20 æggeblommer.