



NORGE

(12) PATENT

(19) NO

(51) Int Cl⁷

(11) 319558

C 12 P 23/00

(13) B1

Patentstyret

| | | | | | |
|------|-----------------------|--|------|---------------------------|------------------------------|
| (21) | Søknadsnr | 19983423 | (86) | Int.inng.dag og søknadsnr | 1997.01.30 PCT/IL97/00042 |
| (22) | Inng.dag | 1998.07.24 | (85) | Videreføringsdag | 1998.07.24 |
| (24) | Løpedag | 1997.01.30 | (30) | Prioritet | 1996.02.01, IL, 116995 |
| (41) | Alm.tilgj | 1998.10.01 | | | |
| (45) | Meddelt | 2005.08.29 | | | |
| (73) | Innehaver | Ben-Gurion University of the Negev Research and Development Authority, P.O. Box 1025, Beer Sheva, IL | | | |
| (72) | Oppfinner | Sammy Boussiba, Omer, IL Avigad Vonshak, Midreshet Sede-Boker, IL Zvi Cohen, Omer, IL Amos Richmond, Midreshet Sede-Boker, IL | | | |
| (74) | Fullmektig | Zacco Norway AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO, NO | | | |
| (54) | Benevnelse | Fremgangsmåte for stor-skala produksjon av astaxanthin fra haematococcus | | | |
| (56) | Anførte publikasjoner | Chem. Abst., vol. 125, abs. nr. 219715, 1996, Harker, M. et al. JP-A-05068585 | | | |
| (57) | Sammendrag | | | | |

Fremgangsmåte for dyrking av Haematococcus celler for storskalaproduksjon av astaxantin-anrikede Haematococcus celler omfattende (a) dyrking av Haematococcus celler under betingelser som er egnet for optimal vegetativ vekst der tilstanden omfatter dyrking av celler under en lysintensitet i område på ca. 30-140 $\mu\text{mol fotoner}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ og ved en temperatur mellom 15-28°C; og (b) oppsamling av cellene som er dyrket ifølge (a) og videre dyrking av dem under betingelser som er egnet for optimal induksjon og akkumulering av astaxantin der betingelsene omfatter inokkulering av cellene fra (a) inn i en vekstopplosning som inneholder hovedsakelig en karbonkilde, og dyrking av cellene ved en temperatur under 35°C.

Oppfinnelsen angår en fremgangsmåte for dyrking av haematococcus-celler for stor-skala produksjon av astaxantin. Foreliggende oppfinnelse angår også en fremgangsmåte for stor-skala produksjon av astaxantin-anrikkede haematococcus celler.

Haematococcus er en gruppe av grønne mikroalger som har evne til å akkumulere en stor mengde av et keto-karotenoid, astaxantin, under visse miljømessige betingelser (Boussiba et al. 1992). Astaxantin er hovedpigmentet som gir den rød-rosa fargen til laks, ørret og reker, hvis priser i stor grad er bestemt av fargen. Den viktigste kommersielt tilgjengelige kilden for astaxantin er for tiden i form av et syntetisk produkt, som er kostbart (> US\$ 3.000 pr. kg) og kan inneholde astaxantin-forbindelser som har en unaturlig konfigurasjon. Det er nå en trend mot anvendelse av naturlige kilder for fôrnæringsmidler med det formål å preparere fôret for de ovenfor nevnte fisketyper, og således har det vært lett etter en mindre kostbar og naturlig kilde for astaxantin. Denne gruppen av grønne mikroalger synes å være den mest lovende kilden for dette formål. Selv om astaxantin kan bli syntetisert av andre alger, bakterier og noen få sopper (Schroeder & Johnson 1993; Yokoyama & Miki 1995), overgår imidlertid mengde akkumulert av Haematococcus (Boussiba & Vonshak 1991), de mengder som er oppnådd i ovenfor angitte kilder. I henhold til den nåværende utviklingen innenfor akvakultur, forventes det at i år 2000 vil mer enn 100 tonn astaxantin være nødvendig (Johnson & An, 1991; Borowitzka, 1992). Dette potensielle behov kan åpne et stort marked for mikrobiologisk produsert astaxantin. Flere forskningsgrupper har forsøkt å etablere storproduksjonssystemer for Haematococcus. Ingen har imidlertid hatt suksess så langt, på grunn av vanskeligheter med å forbedre astaxantin akkumuleringshastighet, forhindring av kontaminasjon av andre mikroorganismer, og svikt i spesiell fotobioreaktordesign. Et eksempel på tidligere metoder for å produsere astaxantin og andre pigmenter fra Haematococcus er den som er beskrevet i internasjonal patentsøknad nr. WO 89/06910.

H. pluvialis har en unik livssyklus som omfatter to trinn: et grønt, motilt, vegetativt trinn der cellene kontinuerlig deler seg og syntetiserer klorofyll og et rødt, ikke-motilt hviletrinn (cyste) hvor celledeling stopper, klorofyllinnhold forblir konstant og astaxantininnhold og cellulær tørrvekt øker kontinuerlig. Disse to trinnene illustrerer figur 1, som viser grafisk forhold mellom fire parametere forbundet med vekst hos *H. pluvialis*, nemlig klorofyll, astaxantin, tørrvekt og celletall. Optimale miljømessige og ernæringsbetingelser nødvendig for disse to trinnene er relativt forskjellige. For vegetativ vekst er fullt næringsmedium, moderat lysintensitet og tilstrekkelig temperatur og pH essensiell. I hviletrinnet er imidlertid ikke noe næringsmiddel (med unntagelse av

karbon) nødvendig og høyere lysintensitet (f.eks. sollys) er nødvendig for hurtigere astaxantinakkumulering. På grunn av slike forskjeller må de to trinnene bli separert i forskjellige dyrkingssystemer med forskjellige medium. Vekststrategier for hvert trinn er også forskjellig. I det grønne trinnet blir optimale betingelser for celledeling opprettholdt for å oppnå maksimalt celletall. I det røde trinnet må de optimale induktive betingelsene bli tilveiebrakt for astaxantinakkumulering. Til nå har ingen slik prosess blitt utviklet for effektiv storskala, to-trinn eller to-fasevekst av *Haematococcus* celler, hvilke tilfredsstillende behovene i hver av de ovenfor nevnte veksttrinnene av *Haematococcus*-celler. De kjente prosessene har et antall ulemper, inkludert behov for kostbart vekstmedium, apparatur, anvendelse av sterilt utstyr og medier og/eller anvendelse av kostbare antibiotiske midler eller andre anti-mikrobiologiske midler for å hindre kontaminering av de ønskede *Haematococcus*-kulturene av andre mikroorganismer slik som mikroalger, sopp, gjær og bakterier. Slike prosesser er således kostbare og tidkrevende å gjennomføre, og de sørger ikke alltid for et høyt utbytte av *Haematococcus*-celler og/eller av astaxantin i de dyrkede cellene.

Det er derfor et mål med oppfinnelsen å skaffe tilveie en ny to-fase dyrkingsprosedyre som tillater produksjon av vegetative grønne *Haematococcus*-celler under regulerte betingelser med temperatur, lysintensitet og næringsmidler og for induksjon og produksjon av røde *Haematococcus*-celler som er rike på astaxantin under mindre strenge kontrollerte betingelser, ved temperatur og lys, men under betingelser med ernæringsstress som akselererer induksjon og akkumulering av astaxantin i cellene.

Likeledes er det et annet mål med oppfinnelsen å skaffe tilveie en prosess for storskalaproduksjon av astaxantin-anrikede *Haematococcus*-celler ved utnyttelse av ovenfor nevnte to-fase dyrkingsprosedyre.

Andre mål med oppfinnelsen vil fremkomme tydelig fra følgende beskrivelse av oppfinnelsen.

En ny to-fase dyrkingsprosess for stor vekst av *Haematococcus*-celler med formål for stor-skala astaxantinproduksjon har blitt utviklet. Ifølge foreliggende oppfinnelse har det på samme måte blitt utviklet en prosess for stor-skala produksjon av astaxantin-anrikede *Haematococcus*-celler som utnytter forannevnte to-fase dyrkingsprosess for dyrking av *Haematococcus*-celler. I to-fase dyrkingsprosessen i foreliggende oppfinnelse vil første fase tilveiebringe vedlikehold av optimal vegetativ vekst av cellene under regulerte miljøbetingelser. Det første trinn eller fase er kjennetegnet ved at cellene har

kontinuerlig celledeling, og astaxantin/klorofyllforhold mellom ca. 0,1 til 0,4 og en økning i klorofyllinnhold under dyrkingsprosessen, hvilket er en indikasjon på optimal Haematococcus cellevekst. Resultatene oppnådd ifølge foreliggende oppfinnelse indikerer at produksjonshastigheten av celler dyrket under betingelsene i denne første fasen har ca. 0,5 til 0,7 g celler/l kultur/dag.

I den andre fasen av denne prosedyren, ble astaxantininduksjon og akkumulering i cellene oppnådd ved oppsamling av cellene fra ovenfor nevnte grønne cellekultur og utsette dem for stress ved næringsuttømming ved resuspending av celler i springvann anrikede med CO₂, etterfulgt av dyrking av cellene under eksponering for fullt sollys. Det ble funnet ifølge foreliggende oppfinnelse at under disse stressbetingelsene, er cystedannelsen rask og dyrkingsvarigheten er vanligvis ikke lenger enn 5 til 6 dager for oppnåelse av astaxantinanrikede røde celler. I denne andre fasen ble størrelsen på biomasseproduksjon funnet å være i området mellom ca. 0,3 til 0,4 g celler/l kultur/dag, og mengden av astaxantin i cellene er ca. 3 til 5%, slik det ble bestemt fra tørrmasse av celler oppsamlet og tørket etter andre fase av dyrking. Det skal her bemerkes at til nå har ingen dyrkingsprosess hatt hell med å skaffe tilveie Haematococcus-celler der anrikingen av astaxantin er ved slike høye nivåer, de tidligere kjente prosedyrene har tilveiebrakt celler med opptil ca. 2% astaxantin.

Foreliggende oppfinnelse skaffer således til veie:

En fremgangsmåte for dyrking av Haematococcus-celler for storskalaproduksjon av astaxantin-anrikede Haematococcus-celler, kjennetegnet ved at den omfatter:

- (a) dyrking av disse Haematococcus-celler under betingelser som er egnet for optimal vegetativ vekst av disse cellene, der tilstanden omfatter dyrking av celler under en lysintensitet i området på ca. 30-140 $\mu\text{mol fotoner}\cdot\text{m}^{-2}\text{S}^{-1}$ og ved en temperatur mellom 15-28°C; og
- (b) oppsamling av celler dyrket i henhold til (a) og dyrking av dem videre under betingelser som er egnet for optimal induksjon og akkumulering av astaxantin i disse cellene, der betingelsene omfatter inokulering av cellene fra (a) inn i en vekstoppløsning som inneholder hovedsakelig springvann anrikede med CO₂ som en karbonkilde for cellene og dyrking av cellene ved en temperatur under 35°C.

En utførelsesform av prosessen over i oppfinnelsen er anvendelse av egnede fotobioreaktorer for hvert trinn av dyrkingsprosessen, slik som f.eks. et vertikalt panel eller en rørformet fotobioreaktor.

En annen utførelsesform av prosessen over i oppfinnelsen er dyrking av cellene i trinn (a) under betingelser med lysintensitet i området på $70\text{--}90 \mu\text{mol fotoner}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ og ved en temperatur mellom ca $22\text{--}25^\circ\text{C}$.

En annen utførelsesform av prosessen over i oppfinnelsen er dyrking av cellene i trinn (b) under betingelser der temperaturen blir opprettholdt under 32°C .

Foreliggende oppfinnelse skaffer også til veie en prosess for storskalaproduksjon av astaxantin-anrikede *Haematococcus* celler og omfatter dyrking av *Haematococcus*-celler ifølge trinn (a) og (b) av prosessen over i oppfinnelsen, og omfatter videre:

- (c) høsting av celler dyrket i (b) ved oppsamling av disse cellene, konsentrering av de oppsamlede cellene, tørking av de konsentrerte cellene og frysing av de tørkede cellene; og
- (d) prosessering av de frosne tørkede cellene fra (c) ved oppmaling under kryogene betingelser i nærvær av en egnet antioksidant for å oppnå et astaxantin-anrikede produkt.

Andre trekk og utførelsesformer av oppfinnelsen vil fremkomme tydelig fra følgende detaljerte beskrivelse av oppfinnelsen.

Fig. 1 viser grafisk det tidligere bestemte forhold mellom fire parametere for vekst av *Haematococcus pluvialis*: klorofyll (åpne diamanter) astaxantin (fylte diamanter), tørrvekt av celler (fylte sirkler), og celletall (åpne sirkler). Disse fire parametrene er vist for første, vegetative eller "grønne" trinn av cellevekst og for andre "røde" trinn av vekst hvori astaxantin akkumulerer. Disse fire parametrene er vist som deres relative mengder som en funksjon av celleveksttiden (tid i dager). I figuren gir "C-A" uttrykk for innhold av klorofyll (åpne diamanter) eller astaxantin (fylte diamanter), i $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, "T" angir tid (dager), D_w er tørrvekt (fylte sirkler), "CN" er celletall ($\text{X}10^6\cdot\text{ml}^{-1}$) (åpne sirkler), "I" angir første trinnet og "II" andre trinn av cellevekst.

Fig. 2 er et skjematisk flytdiagram av prosessen ifølge oppfinnelsen der *Haematococcus*-celler blir tilberedt for storskaladyrking ved første dyrking på agarplater eller skråninger (1), etterfulgt av vekst i suksessivt større flytende kulturer (2), (3), og inokulering av kulturene fra (3) på en fotobioreaktor av vertikalpaneltype (4) for å fremme storskala vegetativ eller "grønn" cellevekst under regulerte betingelser. Astaxantininduksjon og akkumulering skjer ved inokulering av celler fra fotobioreaktoren (4) inn i en annen fotobioreaktor av rørformet fotobioreaktortype (5) under stressbetingelser (næringsuttømming og høyere lysintensitet) som er gunstig for astaxantininduksjon. Prosessering av astaxantin-anrikede celler blir tilveiebrakt ved oppsamling av cellene fra fotobioreaktoren av (5) og utsette dem for sedimentering i en trakt (6) etterfulgt av sentrifugering (7) av de sedimenterte cellene for å skaffe tilveie en konsentrert cellepellets som blir oppmalt under kryogene betingelser i en støtinnretning (8) for å gi et astaxantin-anrikede produkt. Det astaxantin-anrikede produktet fra (8) kan deretter bli innført som en ingrediens i fiskemat (9) for forskjellige typer av kommersielt viktig fisk f.eks. laks, ørret, reker etc. (10). Prosessen over er beskrevet i det etterfølgende i detalj i den eksemplifiserte utformingen av oppfinnelsen.

Foreliggende oppfinnelse angår fremgangsmåter for dyrking av *Haematococcus*-celler for storskalaproduksjon av astaxantin-anrikede *Haematococcus* celler; og for storskalaproduksjon av astaxantin-anrikede celler som benytter en slik dyrkingsprosess.

Med foreliggende oppfinnelles formål kan et hvilket som helst antall stammer av *Haematococcus* bli benyttet, f.eks. stammer slik som de som er vist i tabell 1 under.

TABELL 1 *Haematococcus* stammer og arter

| Stammer og arter | Kilde |
|---|---------------------|
| <i>H. pluvialis</i> flotow | CCAG, Gottingen |
| <i>H. pluvialis</i> flotow | NIES Tsukuba, Japan |
| <i>H. locustris</i> UTEX 16 | CCAT, USA |
| <i>H. pluvialis</i> flotow ETTL 1958/3 | Ceska republika |
| <i>H. pluvialis</i> Flo-TAKAOOVA 1983/1 | Ceska republika |
| <i>H. Droebakensis</i> CCAP 43/2G | CCAP, UK |
| <i>H. pluvialis</i> Flo. 1844 em. Willie K-0084 | SCCAP, Danmark |

Stammene over er veldokumenterte innenfor fagområdet. Den foretrukkede stammen i henhold til oppfinnelsen er stammen eksemplifisert her under, H. Pluvialis Flo. (K-0084), som har en meget lav tendens til klyngedannelse, hvilket gjør den særlig egnet for storskalakulturer.

Det er underforstått at en hvilken som helst annen stamme av Haematococcus som effektivt kan være gjenstand for prosessene ifølge oppfinnelsen også kan benyttes i overensstemmelse med oppfinnelsen.

Mange dyrkingsbetingelser og dyrkningsmedia er kjent for småskalastamskulturer og storskalakulturer av Haematococcus-celler. Med formålet i oppfinnelsen har det blitt funnet at de optimale dyrkingsbetingelsene og mediene i virkeligheten er de relativt enkle dyrkingsbetingelsene og mediene som er beskrevet under, disse er derfor de foretrukkede i sammenheng med oppfinnelsen.

Selv om mye apparatur, systemer og betingelser har blitt beskrevet for vekst av Haematococcus-celler, hadde ingen av disse evne til å skaffe enkel, effektiv og rimelig optimalisering av de to fasene av Haematococcus cellevekst. Det foretrukkede systemet, apparatur og betingelser i foreliggende oppfinnelse er de som er eksemplifisert under.

For oppnåelse av astaxantin-anrikede produkt fra induserte «røde» Haematococcus-celler, har mange prosedyrer blitt beskrevet, f.eks. prosedyre i WO 89/06910. Selv om disse prosedyrene kan benyttes ifølge foreliggende oppfinnelse, er den foretrukkede prosedyren den med sedimentering av oppsamlede røde celler i en trakt, basert på deres tendens til å sedimentere, etterfulgt av sentrifugering eller filtrering under vakuum for videre å konsentrere cellene og tørking av de konsentrerte cellene. Den tørkede celledmassen blir deretter fortrinnsvis lagret ved meget lave temperaturer (f.eks. -80°C eller ennå lavere) under oksygenfrie betingelser, f.eks. ved vakuumpakking, eller ved innføring i plastposer eller lignende sammen med nitrogen (for å fjerne oksygen).

Sluttrinnet for produksjon av astaxantin-anrikede produkt i form av småpartikler som enkelt kan spises av fisken kan også bli gjennomført på et antall måter som tidligere beskrevet innenfor fagområdet (f.eks. WO 89/06910). Den foretrukkede prosedyren er en som er eksemplifisert under, som involverer anvendelse av en standard støtkvern hvori den tørkede celledmassen blir oppmalt under kryogene betingelser i nærvær av en hvilken som helst egnet antioksidant for å hindre oksidasjon av det astaxantin-anrikede

produkt. Dette gir et pulverlignende produkt med liten partikkelstørrelse som særlig er nyttig som et additiv til fiskefôr, disse små astaxantin-rike partiklene er enkle å fordøye.

Foreliggende oppfinnelse vil nå bli beskrevet i følgende ikke-begrensede eksempel og etterfølgende tegning.

Dyrkingsprosedyre for dyrking av Haematococcus stammer:

Prosedyre for kultivering av astaxantinproduserende stammer av Haematococcus ifølge foreliggende oppfinnelse består av to faser, fase I og fase II:

A. Fase I:

Dyrking av Haematococcus stammer under kontrollerte miljøbetingelser for optimal vekst av Haematococcus stammer i deres såkalte «grønne trinn» av vekst.

En foretrukket Haematococcus stamme, Haematococcus pluvialis Flo. (Stamme nr. K-0084) ble oppnådd Scandinavia Culture Center for Algae and Protozoa, Universitetet i København, Danmark og ble dyrket i vekstmedium som var et modifisert BG-11 medium inneholdende:

- (i) 0,32 g/l $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$;
- (ii) 0,2 g/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; og
- (iii) 0,1 g/l Na_2CO_3 ,

i tillegg til andre mineralbestanddeler inneholdt i standard BG-11 vekstmedium (se f.eks. Boussiba et al., 1992; Boussiba og Vonshak, 1991). Tilsetningen over av fosfat, magnesium og karbonat har vist å skaffe tilveie optimale betingelser for vekst i det grønne trinnet av cellene. Ikke-modifisert BG-11 medium kunne ikke støtte langtids kulturer eller tette kulturer fordi den har mindre av disse additiver, slike kulturer i ikke-modifisert BG-11 kommer ofte inn i det røde trinnet av vekst (se også fig. 1) tidligere enn ønsket, dvs. før optimalmengden av «grønne celler» har blitt oppnådd.

Basalmediet ble vanligvis blandet med modifisert BG-11 medium for optimal vekst av Haematococcus stamme bare i det initiale trinnet for vekst av celler på agarplater eller skråninger. Basalmedium som ble anvendt var Standard Basal medium, beskrevet av Kobayashi et al. (1991).

Fase I vekstprosedyren har følgende trinn:

- (a) Dyrking av *Haematococcus* på faste agarskråninger eller plater: En aksen stamme (ovenfor beskrevne *H. Pluvialis* stamme) ble dyrket og opprettholdt i faste agarskråninger eller plater inneholdende en blanding av modifisert BG-11 medium og Basal medium (1:1 v/v) under betingelser med lysintensitet i området mellom 30-40 $\mu\text{mol fotoner}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ved 20°C (se trinn (1), fig. 2).
- (b) Dyrking av flytende stamkultur av *Haematococcus*: *Haematococcus*-celler fra agarplater eller skrån timer av (a) over blir inokulert i 100 ml flytende medium (som er modifisert BG-11 medium som i (a)) i 250 ml kulturflasker og deretter i større flasker (eller til og med glasskolonner) på mellom 500 ml - 2,5 l volum (se trinn (2) og (3), fig. 2). Flaskene var inkubert i en standard gyratorisk inkubator som har en regulerbar lyskilde under betingelser med lysintensitet i området mellom 50 til 70 $\mu\text{mol fotoner}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ved 23°C (eller når glasskolonnene ble anvendt) risting ved hjelp av belufting med en luftblanding inneholdende 1,5% CO₂ v/v). Kulturer av *Haematococcus* oppnådd i disse flytende stamkulturene er kulturer av såkalt «grønn kultur» type, *Haematococcus*-cellene er i det ovenfor-angitte «grønne trinn» av vekst.
- (c) Produksjon av stor-skala kulturer av *Haematococcus* i en fotobioreaktor. De grønne kulturene fra de flytende stamkulturene (eller inocula) av (b) over blir inokulert i en fotobioreaktor, hvori algene blir ristet med en blanding av 0,5% CO₂ i luft. Denne ristingen tjener også til å forhindre klumpedannelse av cellene. Det skal bemerkes at den foretrukke stammen *H. pluvialis* Flot. faktisk har en ekstremt lav tendens til å klumpe seg, en annen fordel ved denne stammen. Den foretrukke fotobioreaktoren som ble anvendt for disse storskalakulturene var en vertikal paneltype fotobioreaktorer (se Tredici et al., 1991) som har et meget stort overflateareal med hensyn på volum for optimal storskalaproduksjon av *Haematococcus*-cellene i «grønt trinn» av vekst (se trinn (4), fig. 2). I denne fotobioreaktoren, ble initiell *Haematococcus* cellekonsentrasjon justert til mellom 0,1 og 0,3 x 10⁶ celler/ml ved fortyning med friskt modifisert BG-11 medium. Lysintensiteten ble holdt i området mellom 70-90 $\mu\text{mol fotoner}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ slik det er tilveiebrakt med standard hvite 40 watts fluoressenserende kjølelamper. Temperatur i fotobioreaktoren ble opprettholdt i området mellom 22-25°C. Under disse dyrkingsbetingelsene var det mulig å oppnå en hastighet på *Haematococcus* celleproduksjon i området mellom 0,5-0,7 g celler/liter kultur/dag.

Fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen som er beskrevet over for storskalaproduksjon av Haematococcus-celler i deres «grønne trinn» av vekst ble funnet å være særlig fordelaktige for oppnåelse av store mengder celler, mens det samtidig forhindrer kontaminering av storskalakultur fra andre mikroorganismer, f.eks. andre alger, sopp, bakterier og lignende; og dette uten behov for tilsetning av antibiotika eller andre anti-mikrobiologiske midler til kulturmediet for å hindre slik kontaminering. Denne fordel ble oppnådd ved anvendelse av en relativt høy initiell Haematococcus cellekonsentrasjon som tillot Haematococcus (*H. Pluvialis*) celler å dominere umiddelbart etter inokulering i fotobioreaktoren, for dermed å forhindre mulige kontaminerende mikroorganismer å vokse i fotobioreaktoren. Denne prosedyren er særlig effektiv for dyrking av storskalakulturer av Haematococcus, fordi den effektivt forhindrer kontaminering av andre mikroorganismer uten behov for kostbare og tidkrevende trinn slik som forsiktig sterilisering av all apparatur og medier, og anvendelse av antibiotika eller andre anti-mikrobiologiske midler.

B. Fase II:

Dyrking av Haematococcus stammer under betingelser for induksjon og akkumulering av astaxantin i Haematococcus celler - såkalt «rødt trinn» av Haematococcus dyrking.

Som nevnt for fase I-dyrkingsprosedyren (A over), var Haematococcus stammen som ble valgt for denne fase II-dyrkingsprosedyren Haematococcus pluvialis Flo. (stamme nr. K-0084). Fase II-dyrkingsprosedyren var som følger:

- (a) Dyrkingsinnretningen som ble anvendt var en standard rørformet fotobioreaktor (se trinn (5), fig. 2, og se Richmond et al., 1993), som hadde volumer i området fra 100-1000 liter, avhengig av den ønskede produksjonsstørrelsen, og som inneholder som integrerte komponenter, kommersielt tilgjengelig PVC, akryl (pleksiglass) eller polykarbonatrør som har en diameter på ca. 3,2 cm. Under operasjon blir kulturen (Haematococcus-celler i springvann, til hvilken det er tilsatt CO₂ - se under) sirkulert gjennom innretningen ved å anvende en luftløftpumpe. Det skal bemerkes at for storskalakulturer eller til og med småskalakulturer er det mulig å anvende en standard diafragma-pumpe i stedet for en luftløftpumpe.
- (b) For dyrking av Haematococcus-celler i deres «røde trinn» av vekst, ble grønne celler oppnådd fra fase I-dyrkingsprosedyren (A over) anvendt som inokulering for ovenfor nevnte rørformige fotobioreaktor. Optimalt ble den rørformige fotobioreaktoren

plassert utendørs, dette under betraktning av dens størrelse, så vel som det faktum at i «rød trinn» vekst, krever ikke *Haematococcus*-cellene kontrollert lysintensitet som de krever i sitt «grønne trinn» av vekst, således er sollys ugunstig, og dermed vil denne dyrkingsprosedyren også skaffe tilveie en meget økonomisk måte for å produsere *Haematococcus*-celler, og mer spesifikt å skaffe tilveie mindre stressbetingelser for akselerering av astaxantininduksjon og akkumulering i disse cellene.

De grønne cellene blir inokulert i form av en suspensjon av grønne celler i springvann, vanligvis oppnådde grønne celler fra fase I dyrking som ble suspendert på nytt i springvann i en tilnærmet 1:3 fortykning. Til suspensjonen av de grønne cellene i den rørformede fotobioreaktoren, ble CO₂ tilsatt (injeksjon inn i rørene av innretningen). Temperaturen i den rørformede fotobioreaktoren ble opprettholdt ved temperaturer under 32°C.

Det skal imidlertid bemerkes at i et antall eksperimenter ble det funnet at cellene fra det grønne trinnet av veksten kan bli samlet, konsentrert ved naturlig sedimentering på grunn av deres tendens til sedimentering, og lagret i et kaldt rom (ved ca. 5°C) i opptil 2-3 uker før deres inokulering inn i fotobioreaktoren av det andre trinnet (rødt trinn) av veksten. Celler oppsamlet og lagret på denne måten har således blitt uttømt for sitt initiale næringsmedium, som også tjener til å indusere stress i cellene og således astaxantinproduksjon. Faktisk viste celler lagret på denne måten og deretter innført i rødt trinn vekstbetingelsene en raskere overgang til det røde trinnet og således en raskere induksjon og akkumulering av astaxantin.

Evnen til å stoppe vekst i det grønne trinnet og samle cellene har en annen fordel, ved at den også tillater en satsvis produksjonsprosess, nemlig at det ikke er essensielt å gå direkte fra det grønne trinnet til det røde trinnet i veksten, et intervall kan bli innført om ønskelig under betraktning av produksjonsbehov og begrensninger. Denne evnen til å stoppe prosessen mellom de grønne og røde trinnene av veksten var ikke blitt beskrevet før foreliggende oppfinnelse.

Det ble observert at under ovenfor nevnte fase II vekstbetingelser, var hastigheten på produksjon av *Haematococcus* celler ca. 0,3-0,4 g celler/l kultur/dag, og at *Haematococcus*-cellene inneholdt ca. 4% astaxantin. Fase II dyrkingsprosedyren ble vanligvis gjennomført i ca. 4-6 dager før høsting og tørking av cellene som er rike på astaxantin. Den ovenfor angitte mengden av astaxantin akkumulert i cellene har ikke blitt oppnådd i noen av de tidligere beskrevne storskalaprosessene.

Når det gjelder fase II dyrkingsprosedyren over, ble det også observert at for utendørs kulturer, særlig de som vokser i sommermånedene når omgivelsestemperaturer noen steder kan nå, så høyt som 40-45°C, at temperaturkontroll er kritisk. Som angitt over for optimal dyrking av *Haematococcus*-celler, er det nødvendig å opprettholde temperaturen i den rørformede fotobioreaktoren under 32°C, dette har blitt oppnådd ved anvendelse av en vannspray, der kaldt vann ble sprayet direkte på den rørformede fotobioreaktoren for å opprettholde dens temperatur under 32°C.

I det «røde trinnet» av vekst, krever *Haematococcus* cellene bare karbon som hovednæringskilde, dette har blitt supplert som angitt overfor ved injeksjon av CO₂ direkte i rørene av den rørformede fotobioreaktoren. Denne injeksjon av CO₂ kan bli gjennomført under dagen og i løpet av natten. CO₂ er bare vesentlig i løpet av dagen, og således kan ytterligere besparelse på CO₂ bli oppnådd ved å stoppe injeksjonen i løpet av natten.

Alle fase II dyrkingsbetingelser, særlig krav om at *Haematococcus*-celler bare får karbon som hovednæringskilde og dens tilførsel i form av CO₂, opprettholdelse av dyrkingstemperaturer under 32°C, og inokulering av relativt store mengder celler ved utløpet (grønne celler fra fase II-dyrking har en høy cellekonsentrasjon og blir bare fortynnet ca. 1:3 før inokulering inn i innretningen for fase II-dyrking), alle tjener også til å eliminere nesten fullstendig muligheten for kontaminering av andre mikroorganismer, slik som f.eks. andre mikroalger av fase II kulturer.

Ovenfor nevnte fase II-dyrkingsprosedyre i oppfinnelsen skaffer til veie et antall fordeler i forhold til tidligere beskrevne prosedyrer:

- (i) Den er meget effektiv for *Haematococcus* cellebiomasseøkning, så vel som for induksjon og akkumulering av astaxantin i disse cellene: rutinemessig for å oppnå ca. 0,3-0,4 g celler/liter kultur/dag av *Haematococcus*-celler som inneholdt ca. 4% astaxantin pr. celle, for slike kulturer som vanligvis ble dyrket i ca. 5 dager.
- (ii) Den er meget økonomisk, som basisinnretning, er den rørformige fotobioreaktoren relativt rimelig, og kan bli plassert utendørs og krever ikke kostbart vedlikehold eller høyt utdannet personell til drift. Videre er dyrkingsbetingelsene ekstremt rimelige, cellene kan bli dyrket i springvann (ikke destillert eller sterilisert vann eller medier er nødvendig), med tilsetning av hovedsakelig CO₂ som hovednæringskilde.

(iii) Den overvinner hovedproblemet som møtes i teknologien til dags dato, der problemet med kontaminering av kulturene fra andre mikroorganismer, slik som f.eks. andre mikroalger ved at det ikke er behov for noe antibiotika eller andre antimikrobiologiske midler. De relativt enkle dyrkingsbetingelsene, i fase II prosedyren ifølge oppfinnelsen, av et høyt celletall inokulert initielt, med minimal vekstmedium (springvann) som bare har en karbonkilde (CO_2) og temperaturkontroll under 32°C , og utendørsdyrking i et lukket apparatur (ringformet fotobioreaktor), tjener da til å hindre mulighet for kontaminering av andre mikroorganismer.

Når det gjelder de forskjellige betingelsene med lysintensitet og temperaturkontroll, skal det bemerkes at i et antall eksperimenter rettet til optimalisering både av disse parametrene i de grønne og røde trinnene av vekst, ble det observert at:

- a) lysintensiteten i den grønne fasen kunne være et eller annet sted i området fra 60-110 $\mu\text{mol fotoner}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ og temperatur kan også være i området mellom $18-28^\circ\text{C}$. De beste resultatene ble oppnådd med ovenfor nevnte smale områder av lysintensitet og temperatur.
- b) Øvre temperaturgrense i rødt trinn/fase kunne faktisk nå 35°C , mens lave grense i dette trinnet kunne være så lav som 2°C . De beste resultatene ble oppnådd når øvre grense ble holdt under 32°C og nedre grense ved 15°C .

I både rødt og grønt trinn var det mulig å anvende en hvilken som helst av antall fotobioreaktorer, f.eks. i det grønne trinnet, kan samme type reaktor som ble anvendt i det røde trinnet bli benyttet så lenge de optimale dyrkingsbetingelsene blir opprettholdt; og i det røde trinnet, kan en paneltypereaktor som ble anvendt i det grønne trinnet også bli anvendt for å tilveiebringe like gode resultater. En ringformet reaktor der algene blir sirkulert ved hjelp av en pumpe har også blitt anvendt med suksess.

C. Høsting av Haematococcus celler etter «rødt trinn» dyrkingsprosedyren (fase II dyrking).

Etter fase II dyrking av Haematococcus celler (B over) er hver dyrkingssyklus ca. 5 til 6 dager optimalt, etter høstingsprosedyren var gjennomført basert på det faktum at Haematococcus-celler (særlig røde celler), særlig de fra H. Pluvialis stamme, benyttes i overensstemmelse med oppfinnelsen, sedimentet er raskt, samles med en gang fra den rørformede fotobioreaktoren. Biomasse fra de røde cellene fra den rørformede fotobioreaktoren ble samlet i en standardtrakt med stort volum (f.eks. en Imhoff trakt), se trinn (6), fig. 2) og fikk stå i noen få timer (ca. 3-5 timer) for å forenkle sedimentering av de røde cellene. Det ble funnet at tilnærmet 30% av det totale volum med biomasse med den rørformede bioreaktoren representerte sedimentet av røde celler, mens det gjenværende ca. 70% av totalt oppsamlet volum representerte springvann som ble anvendt i fase II dyrkingen. Dette springvannet kunne på enkel måte samles og ble anvendt for en ny rørformet bioreaktorinokulering og fase II kultiveringsprosedyre (dvs. opprinnelig anvendt springvann er nesten fullstendig resirkulerbart), og dette er en annen fordel ved fremgangsmåten i oppfinnelsen.

Den ovenfor nevnte sedimenterte og konsentrerte røde Haematococcus cellekulturen ble deretter samlet fra trakten utsatt for sentrifugering eller vakuumfiltrering for videre konsentrering av de røde cellene. Et biomasseutbytte på ca. 40% faste stoffer (pellet av røde celler) ble rutinemessig oppnådd etter sentrifugeringstrinnet (se trinn (7), fig. 2), eller ca. 30% faste stoffer etter vakuumfiltrering. Tilnærmet 60% av totalvolumet som er utsatt for sentrifugering; eller tilnærmet 70% av totalvolumet som er utsatt for vakuumfiltrering, er supernatantvolumet, og kunne også bli samlet og anvendt for en ny runde av fase II dyrkingsprosedyren, denne supernatanten er primært opprinnelig springvann som ble anvendte i fase II prosedyren.

Den konsentrerte røde cellepelletten oppnådd fra sentrifugeringstrinnet over ble deretter tørket, fortrinnsvis ved lyofilisering, selv om spraytørring også viste seg å være effektiv. Det resulterende tørkede pulveret ble homogenisert, pakket i en plastpose som på forhånd ble fylt med nitrogen for å fjerne oksygen (som forårsaker pigmentoksidering, dvs. degradering av astaxantin) og deretter lagret ved -20°C før prosessering å fremstille fôradditivet for fiskefarging.

Høstingsprosedyren over ifølge oppfinnelsen er særlig fordelaktig ved at standardutstyr kan benyttes og både utstyr og vedlikehold er generelt rimelig og krever ikke høyt utdannet personell for drift. Ca. 70% av det initielle røde celledyrkingsvolumet oppnådd fra fase II dyrking er resirkulerbart for videre fase II dyrking, og er ytterligere 60% av den initielle sedimenterte røde cellebiomassen, som oppnådd fra etterfølgende sentrifugering av sedimenterte røde celler, også resirkulerbar for videre fase II dyrking. Til og med en billig kilde som springvann som ble anvendt i fase II dyrkingen, er nesten fullstendig resirkulerbar i prosessen i oppfinnelsen.

D. Prosessering av høstede og konsentrerte røde Haematococcus-celler for ekstraksjon av astaxantin

Det tørre pulveret av Haematococcus-celler lagret ved -20°C (C over) ble oppmalt under disse kryogene betingelsene. Den valgte apparaturen som ble anvendt var en standard oppmalingskvern (se trinn (8), fig. 2). For å hindre oksidasjon av astaxantin under oppmalingsprosedyren, ble en kommersiell antioksidant anvendt slik som f.eks. etoksyquin, butylert hydroksyanisol, butylert hydroksytoluen (BHT), tokoferoler, di-tert-butyl-paracresol og propylgallat. Den foretrukkede antioksidanten ble funnet å være BHT, som også har en U.S.-FDA godkjenning som gjør den særlig akseptabel, og i de tilfeller som foreliggende, der sluttproduktet har til hensikt å bli anvendt som et foradditiv for fisk, som endelige er beregnet for menneskelig konsum. Avhengig av antioksidant som ble anvendt, vil vanligvis mengden av anti-oksidadant som blir tilsatt oppmalingsprosedyren være i området fra ca. 0,05 til 5% (v/v) av mengden av tørt pulver som blir oppmalt.

Det ble rutinemessig funnet at prosesseringsprosedyren over bare resulterte i et tap på ca. 10% av astaxantin.

Oppmalt pulver som inneholder antioksidant for preservering av astaxantin mot oksidasjon, slik det er oppnådd i fremgangsmåten over, kan deretter bli utnyttet direkte eller i blanding med andre ingredienser, f.eks. spiselige oljer og lignende, som et additiv til fiskekjøtt med det formål av farge, som nevnt over (se trinn (9) og (10) i fig. 2).

REFERANSER

- Borowitzka, MA (1992) Algal biotechnology products and processes - matching science and economics. *J. Appl. Phycol.* 4: 267-279.
- Boussiba, S., Fan, L., Vonshak, A. (1992) Enhancement and Determination of Astaxanthin Accumulation in Green Alga *Haematococcus pluvalis*. *Methods in Enzymology*, 213, Carotenoids Part A, Lester Packer (ed.), Academic Press: 386-371.
- Boussiba, S., Vonshak, A. (1991) Astaxanthin Accumulation in Green Alga *Haematococcus pluvalis*. *Plant Cell Physiology*, 32: 1077-1082.
- Johnson, E.A., An., G.H. (1991) Astaxanthin from Microbial Sources. *Critical Reviews in Biotechnology*, 11: 297-326.
- Kobayashi, M., Kakizono, T., Nagai, S. (1991). Astaxanthin Production by a Green Alga *Haematococcus pluvalis*. Accompanied with Morphological Changes in Acetate Media, *J. of Fermentation and Bioengineering*, 71: 335-339.
- Richmond, A., Boussiba, S., Vonshak, A., Kopel, R. (1993) A new tubular reactor for mass production of microalgae outdoors, *J. Appl. Phycol.* 5: 327-332.
- Schroeder, W.A., Johnson, E.A., (1993) Antioxidant role of carotenoids in *Phaffia rhodozyma*. *J. General Microbiology* 139: 907-912.
- Tredici, M.R., Carlozzi, P., Chini Zittelli, G., Materassi, R. (1991). A vertical alveolar panel (VAP) for outdoor mass cultivation of microalgae and cyanobacteria. *Bioresource Technology*, 38: 153-159.
- Yokoyama, A., Miki, W. (1995). Composition and presumed biosynthetic pathway of carotenoids in the astaxanthin-producing bacterium *Agrobacterium aurantiacum*. *FEMS Letters* 128: 139-144.

P a t e n t k r a v

1.

Fremgangsmåte for dyrking av Haematococcus-celler for storskalaproduksjon av astaxantin-anrikkede Haematococcus-celler, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter:

- (a) dyrking av disse Haematococcus celler under betingelser som er egnet for optimal vegetativ vekst av disse cellene, der tilstanden omfatter dyrking av celler under en lysintensitet i området på ca. 30-140 $\mu\text{mol fotoner}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{S}^{-1}$ og ved en temperatur mellom 15-28°C; og
- (b) oppsamling av celler dyrket i henhold til (a) og dyrking av dem videre under betingelser som er egnet for optimal induksjon og akkumulering av astaxantin i disse cellene, der betingelsene omfatter inokulering av cellene fra (a) inn i en vekstoppløsning som inneholder hovedsakelig springvann anrikket med CO₂ som en karbonkilde for cellene og dyrking av cellene ved en temperatur under 35°C.

2.

Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at de optimale vegetative vekstbetingelsene fra (a) skjer ved dyrking av disse cellene i en fotobioreaktor for å forenkle de regulerte miljøbetingelsene av lysintensitet og temperatur.

3.

Fremgangsmåte ifølge krav 2, k a r a k t e r i s e r t v e d at fotobioreaktoren er en vertikal fotobioreaktor.

4.

Fremgangsmåte ifølge krav 2, k a r a k t e r i s e r t v e d at fotobioreaktoren er en rørformet panelfotobioreaktor.

5.

Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1-4, k a r a k t e r i s e r t v e d at vekstbetingelsene i (a) videre omfatter dyrking av disse cellene i modifisert BG-11 medium og risting av cellene ved strøm av en blanding av CO₂ i luft gjennom kulturen.

6.

Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1-5, k a r a k -
t e r i s e r t v e d at den initielle konsentrasjon av celler som ble
anvendt for dyrking (a) er ca. $0,1-0,3 \times 10^6$ celler/ml.

7.

Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1-6, k a r a k -
t e r i s e r t v e d at dyrkingstrinnet (a) omfatter betingelsene for
dyrking av celler under en lysintensitet i området på ca. $70-90 \mu\text{mol fotoner}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ og
ved en temperatur mellom ca. $22-25^\circ\text{C}$.

8.

Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1-7, k a r a k -
t e r i s e r t v e d at de optimale betingelsene for induksjon og
akkumulering av astaxantin i cellene fra (b) er ved dyrking av disse cellene i en
fotobioreaktor for å forenkle effektiv opprettholdelse av temperaturen under 35°C .

9.

Fremgangsmåte ifølge krav 8, k a r a k t e r i s e r t v e d at
fotobioreaktoren er en rørformet bioreaktor.

10.

Fremgangsmåte ifølge krav 8 eller 9, k a r a k t e r i s e r t v e d
at vekstbetingelsene i (b) videre omfatter dyrking av cellene i en vekstoppløsning som er
kranvann til hvilken det ble tilsatt CO_2 som karbonkilde for cellene.

11.

Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 8-10, k a r a k -
t e r i s e r t v e d at dyrkingen i (b) blir gjennomført utendørs og
lyskilden for cellene er sollys.

12.

Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 8-11, k a r a k -
t e r i s e r t v e d at dyrkingen fra (b) ble gjennomført under betingelser
med temperaturkontroll under 32°C .

13.

Fremgangsmåte for storskalaproduksjon av astaxantinrikede *Haematococcus* celler, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter dyrking av *Haematococcus* celler ifølge et hvilket som helst av kravene 1-12 og som videre omfatter trinnene:

- (c) høsting av celler dyrket i (b) ved oppsamling av disse cellene, konsentrering av de oppsamlede cellene, tørking av de konsentrerte cellene og frysing av de tørkede cellene; og
- (d) prosessering av de frosne tørkede cellene fra (c) ved oppmaling under kryogene betingelser i nærvær av en egnet antioksidant for å oppnå et astaxantin-anrikede produkt.

14.

Fremgangsmåte ifølge krav 13, k a r a k t e r i s e r t v e d at oppsamling og konsentrasjon av disse cellene skjer ved sedimentering etterfulgt av sentrifugering eller filtrering under vakuum, og der tørking av disse cellene skjer ved lyofilisering, eller ved spraytørking.

15.

Fremgangsmåte ifølge krav 13 eller 14, k a r a k t e r i s e r t v e d at oppmalingen av de tørre cellene skjer ved hjelp av en støtkvern.

16.

Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 13-15, k a r a k t e r i s e r t v e d at antioksidanten blir valgt fra gruppen bestående av etoksyquin, butylert hydroksyanisol, butylert hydroksytoluen (BHT), tokoferoler, di-tert-butyl-paracresol og propylgallat.

17.

Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1-12, k a r a k t e r i s e r t v e d at *Haematococcus* cellene er av stammen *Haematococcus pluvialis*.

18.

Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 13-16, k a r a k -
t e r i s e r t v e d at astaxantin-anrikede celler er *Haematococcus*
pluvialis celler.

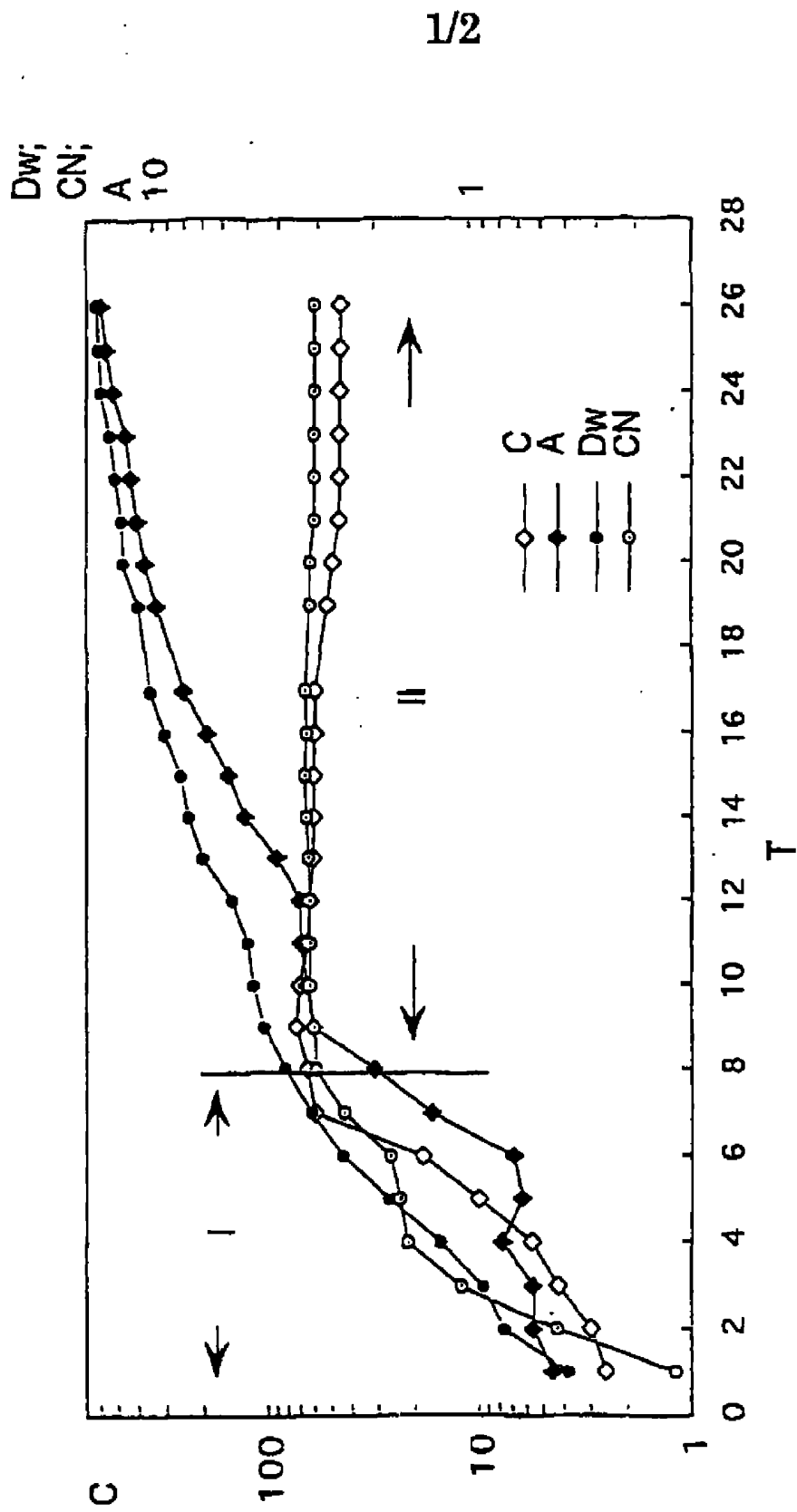


Fig. 1

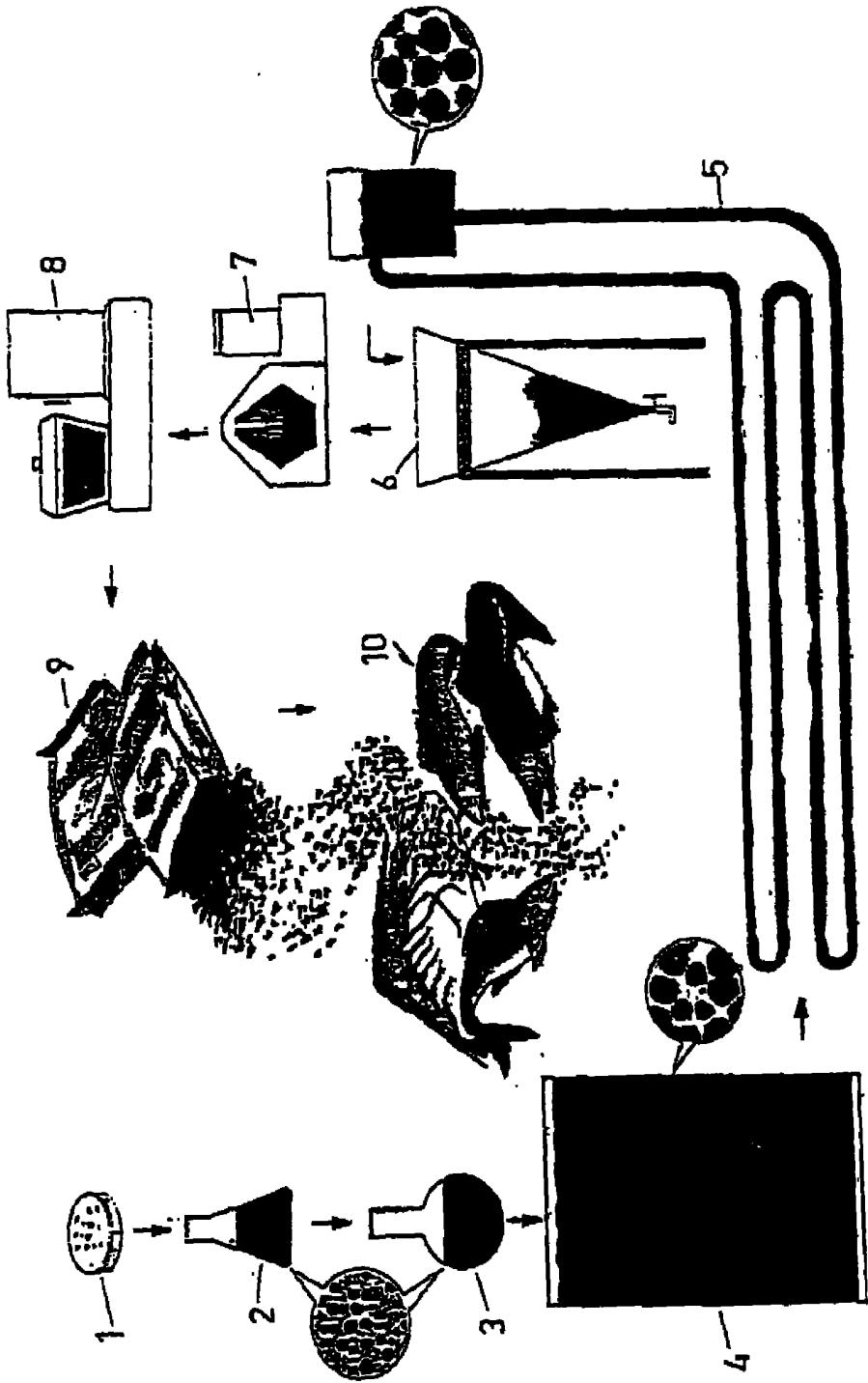


Fig. 2