РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(19) **RU** (11) **2 785 792**(13) **C1**

(51) МПК
C12N 1/16 (2006.01)
C12P 23/00 (2006.01)
A23K 20/179 (2016.01)
C12R 1/785 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
C12N 1/16 *(2022.08);* ***C12P 23/00*** *(2022.08);* ***A23K 20/179*** *(2022.08);* ***C12R 2001/785*** *(2022.08)*

(21)(22) Заявка: **2022123587, 05.09.2022**

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
05.09.2022

Дата регистрации:
13.12.2022

Приоритет(ы):
(22) Дата подачи заявки: **05.09.2022**

(45) Опубликовано: **13.12.2022** Бюл. № **35**

Адрес для переписки:
620002, г. Екатеринбург, ул. Мира, 19, УрФУ, Центр интеллектуальной собственности, Маркс Т.В.

(72) Автор(ы):
Глухарева Татьяна Владимировна (RU),
Канвугу Осман Набайире (RU)

(73) Патентообладатель(и):
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования "Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина" (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **CN 103820520 B, 01.02.2017. RU 2273667 C2, 10.04.2006. RU 2631803 C2, 26.09.2017. RU 2529715 C2, 27.09.2014.**

(54) СПОСОБ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ДРОЖЖЕЙ XANTHOPHYLLOMYCES DENDRORHOUS (PHAFFIA RHODOZYMA) НА ОСНОВЕ СОЕВОЙ МЕЛАССЫ И ДРОЖЖЕВОГО ЭКСТРАКТА

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии, а именно к получению астаксантина, и может быть использовано в микробиологической промышленности. Предложен способ приготовления питательной среды для культивирования дрожжей *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). В качестве компонентов ферментационной среды для культивирования используют соевую мелассу в количестве, обеспечивающем общее содержание сахаров в питательной среде 14–21 г/л, и остаточные пивные дрожжи в количестве, обеспечивающем содержание 2±0.2 г сухих веществ дрожжевого экстракта на литр питательной среды. Изобретение обеспечивает увеличение количества биомассы на 34%, а концентрации астаксантина (г/л) – на 13%. 3 табл.

RU 2785792 C1

RU 2785792 C1

RUSSIAN FEDERATION

FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 785 792**(13) **C1**

(51) Int. Cl.
C12N 1/16 (2006.01)
C12P 23/00 (2006.01)
A23K 20/179 (2016.01)
C12R 1/785 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC
C12N 1/16 *(2022.08);* ***C12P 23/00*** *(2022.08);* ***A23K 20/179*** *(2022.08);* ***C12R 2001/785*** *(2022.08)*

(21)(22) Application: **2022123587, 05.09.2022**

(24) Effective date for property rights:
05.09.2022

Registration date:
13.12.2022

Priority:
(22) Date of filing: **05.09.2022**

(45) Date of publication: **13.12.2022** Bull. № **35**

Mail address:
620002, g. Ekaterinburg, ul. Mira, 19, UrFU, Tsentr intellektualnoj sobstvennosti, Marks T.V.

(72) Inventor(s):
Glukhareva Tatiana Vladimirovna (RU),
Kanvugu Osman Nabaiire (RU)

(73) Proprietor(s):
Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education Ural Federal University named after the first President of Russia B.N.Yeltsin (RU)

(54) METHOD FOR PREPARING NUTRIENT MEDIUM FOR CULTIVATION OF YEAST XANTHOPHYLLOMYCES DENDRORHOUS (PHAFFIA RHODOZYMA) BASED ON SOYBEAN MELACE AND YEAST EXTRACT

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to the field of biotechnology, namely to the production of astaxanthin, and can be used in the microbiological industry. A method for preparing a nutrient medium for cultivating the yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous (Phaffia rhodozyma)* is proposed. As components of the fermentation medium for cultivation, soy molasses is used in an amount that provides a total sugar content in the nutrient medium of 14–21 g/l, and residual brewer's yeast in an amount that provides a content of 2±0.2 g of yeast extract solids per liter of nutrient medium.

EFFECT: invention provides an increase in the amount of biomass by 34%, and the concentration of astaxanthin (g/l) - by 13%.

1 cl, 3 tbl

RU 2785792 C1

RU 2785792 C1

Техническая область: Настоящее изобретение относится к способу приготовления питательной среды для культивирования дрожжей *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*), продуцирующих астаксантин, в котором используются такие возобновляемые ресурсы как соевая меласса и остаточные пивные дрожжи в качестве недорогих компонентов питательной среды.

Предпосылки: Астаксантин (3,3'-дигидрокси-4,4'-дикето-β-β-каротин; $C_{40}H_{52}O_4$) представляет собой красно-оранжевое жирорастворимое ксантофилловое производное β-каротина, продуцируемое почти исключительно микроорганизмами, преимущественно *Haematococcus pluvialis,* в значительной степени *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*), а также некоторыми бактериями. Он также накапливается в большом количестве в морских организмах, таких как лососевые и ракообразные, в результате биоаккумуляции из корма. Астаксантин является одним из наиболее важных микробных каротиноидов в промышленном и экономическом отношении. Особенно он известен благодаря своей выдающейся антиоксидантной активности. Кроме того, было показано, что астаксантин проявляет и другие виды биологической активности как *in vitro*, так и *in vivo*, включая кардио- и нейропротекторные эффекты, антидиабетическую и противораковую активность, иммуномодуляцию, а также противовоспалительную активность и активность против перекисного окисления липидов. Благодаря этим свойствам астаксантин является привлекательным веществом с точки зрения здоровья и питания человека, благодаря чему он пользуется большим спросом в качестве нутрицевтика. Несколько исследований на животных показали, что астаксантин полезен для кожи, поскольку он обеспечивает защиту от ультрафиолетового излучения и обладает омолаживающими свойствами, поэтому он также представляет большой интерес в косметической промышленности. Помимо этого, астаксантин является отличным пигментирующим веществом, и имеет ценность в пищевой промышленности в качестве натурального красителя и, в частности, в аквакультуре для окрашивания мяса лососевых рыб и экзоскелета ракообразных. Также астаксантин применяется для получения полноценных кормов для сельскохозяйственных животных, птиц и пушных зверей.

В настоящее время доступный на мировом рынке астаксантин в основном производится путем химического синтеза, он в основном используется для аквакультуры и состоит из всех трех стереоизомеров астаксантина: (3S,3'S), (3R,3'S)/(3S,3'R) и (3R,3'R). Смесь изомеров в сочетании с растущими опасениями по поводу синтетических добавок делает химически синтезированный астаксантин непривлекательным для потребления человеком. Следовательно, существует растущий спрос на астаксантин из природных источников в пищевой, нутрицевтической и косметической промышленности. В настоящее время основным коммерческим источником природного астаксантина являются очень требовательные пресноводные водоросли *Haematococcus pluvialis*, которые продуцируют в основном (3S,3'S) изомер астаксантина, преобладающий в природе. Наряду с пресноводными водорослями менее требовательными являются красные базидиальные дрожжи *Xanthophyllomyces dendrorhous*, которые продуцируют главным образом изомер (3R,3'R) в качестве основного каротиноида. Хотя их продуктивность по астаксантину относительно низка, *Xanthophyllomyces dendrorhous* привлекли большое внимание как подходящий источник природного астаксантина. При этом, по сравнению с *Haematococcus pluvialis*, *Phaffia rhodozyma* имеет более высокие темпы роста и более простые условия культивирования, плюс дрожжи способны использовать различные источники углерода. Таким образом, благодаря своей способности использовать различные источники углерода и азота *Xanthophyllomyces*

dendrorhous можно выращивать на дешевых альтернативных источниках среды, чтобы немного снизить себестоимость производства природного астаксантина. С этой целью многообещающим подходом является использование агропищевых отходов/побочных продуктов в качестве недорогих альтернатив среды для выращивания этих дрожжей и последующего производства астаксантина. Помимо потенциального снижения себестоимости производства природного астаксантина, выращивание *P. rhodozyma* на агропищевых отходах служит альтернативным способом утилизации этих отходов, что снижает воздействие на окружающую среду, связанное с утилизацией этих отходов/ побочных продуктов.

В качестве источника углерода в питательной среде для культивирования *P. rhodozyma* чаще всего применяется глюкоза, в качестве источников азота - коммерческий дрожжевой экстракт и пептон. Стандартной средой для культивирования *P. rhodozyma* считается среда YPG, содержащая 0,2% дрожжевого экстракта, 1% пептона и 2% глюкозы.

Известен способ культивирования различных штаммов *P. rhodozyma* и получения астаксантина (US 6413736 B1), в котором в качестве источника углерода в питательных средах используется техническая глюкоза, в качестве источника азота - дрожжевой экстракт и/или пептон. Также в состав питательной среды добавляются различные витамины и минеральные вещества. Показано, что возможной является частичная замена глюкозы глицерином.

В патенте US 2005/0124032 A1 описан метод культивирования дрожжей *P. rhodozyma* на питательной среде в состав которой входит глюкоза, дрожжевой экстракт и мука семян хлопка, витамины биотин, тиамин, пантотенат кальция и соли KH_2PO_4, K_2HPO_4, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $(NH_4)_2SO_4$, NaCl, $CaCl_2$, $CaCO_3$.

Известен способ культивирования высокопродуктивных штаммов *P. rhodozyma* (EP 1 479 777 A1) с применением сред, содержащих в основедрожжевой экстракт, муку семян хлопка, глюкозу и кукурузный экстракт, а также витамины биотин, тиамин, пантотенат кальция и большое количество различных минеральных солей.

В патенте RU2529715C2 представлен метод культивирования *P. rhodozyma* с применением питательных сред, на основе ферментолизата крахмала, полученного дроблением некондиционного зерна с последующим разделением на фракции и отхода крахмалопаточного производства - кукурузного экстракта в качестве источника органического азота, а также сульфата аммония.

Наиболее близким настоящему изобретению является метод, описанный в патенте CN103820520B, где для культивирования высокопродуктивного штамма используется питательная среда, содержащая в качестве источников углерода сопутствующие продукты и отходы сельского-производства, такие как початки кукурузы, семена риса и тростниковую патоку, предварительно обработанные и осахаренные.

Настоящее изобретение описывает способ использования соевой мелассы и остаточных пивных дрожжей в качестве дешевых компонентов ферментационной среды для культивирования продуцирующих астаксантин *дрожжей Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). Следует отметить, что в связи с активным развитием рынка сои и индустрии соевых пищевых продуктов в перспективе количество отходов, в том числе соевой мелассы, будет возрастать.

Краткое изложение изобретения: Настоящее изобретение раскрывает способ дешевого культивирования *Xanthophyllomyces dendrorhous(Phaffia rhodozyma*) и биосинтеза астаксантина. В частности, изобретение относится к культивированию красных дрожжей *Phaffia rhodozyma* в ферментационной среде, состоящей исключительно из соевой мелассы

(SM) и дрожжевого экстракта (YE), полученного из остаточных пивных дрожжей. Изобретение включает стадии: 1) Приготовление и стерилизация ферментационных сред на основе соевой мелассы, содержащих 3-10 % масс./об. соевой мелассы (предпочтительно 4-6 %), которые содержат 30-35 % масс./об. общего сахара, и 0,2 % масс./об. дрожжевого экстракта. 2) Получение дрожжевого экстракта может быть осуществлено из остаточных пивных дрожжей, включая следующие стадии: центробежное отделение остаточных дрожжевых клеток от избыточного пива, промывка клеток несколько раз водой, суспендирование клеток в воде, экстракция растворимых компонентов дрожжей путем автолиза, обработки ультразвуком или автоклавирования, центробежного отделения клеточного дебриса и сушки экстракта. 3) Инокуляция ферментационной среды в питательную среду, приготовленную на стадии (1) 48-часовой посевной культурой штамма *Phaffia rhodozyma*. 4) Инкубация культуры на роторном шейкере в течение 5 дней при 12°C при постоянном освещении и встряхивании со скоростью 150 об/мин. 5) Сбор клеток центрифугированием суспензионной культуры, двукратное центрифугирование клеток с водой для промывки. 6) Извлечение продукта ферментации, астаксантина, из клеток дрожжей, включающее стадии: разрушение клеток, экстракцию астаксантина, выпаривание растворителя и количественное определение астаксантина.

Настоящее изобретение раскрывает метод получения дешевой питательной среды, пригодной для роста *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). Настоящее изобретение также направлено на создание альтернативного способа повышения ценности соевой мелассы и остаточных пивных дрожжей, чтобы снизить воздействие этих промышленных отходов на окружающую среду.

Подробное описание: Настоящее изобретение описывает способ дешевого культивирования продуцента астаксантина - *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*) в культуральной среде, состоящей из соевой мелассы в качестве единственного источника углерода и дрожжевого экстракта. Техническая схема настоящего изобретения, описанная ниже, относится к культурам во встряхиваемых колбах. Однако настоящее изобретение может быть адаптировано для крупномасштабного производства специалистами в данной области с использованием соответствующих технологий, устройств и оборудования, известных в данной области. Объем настоящего изобретения не должен ограничиваться приведенными ниже описаниями и может быть соответствующим образом изменен без отклонения от сущности настоящего изобретения. Для достижения цели изобретение принимает следующую техническую схему:

Приготовление среды на основе глюкозы: среда на основе глюкозы (YPG) состоит из 0,2% дрожжевого экстракта, 1% пептона и 2% глюкозы. Два раствора, один из которых содержал желаемое количество пептона и дрожжевого экстракта, растворенных примерно в 20% от общего количества необходимой воды, а другой состоял из глюкозы, растворенной в оставшейся части от общего количества необходимой воды, готовили в отдельных конических колбах с ватными пробками и автоклавировали при 121°C в течение 20 мин. После охлаждения до комнатной температуры два раствора смешивали в стерильных условиях, получая среду YPG, содержащую на литр 20 г глюкозы, 2 г дрожжевого экстракта и 10 г пептона. При необходимости добавляется стерильная вода для компенсации потери объема во время стерилизации. Эту среду использовали для приготовления посевной культуры и в качестве контрольной среды в конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения.

Приготовление среды на основе соевой мелассы: желаемое количество соевой мелассы

(SM) точно отвешивают в коническую колбу с ватным тампоном. Добавляют около трех четвертей от общего количества воды, необходимого для достижения желаемой концентрации, и тщательно перемешивают. Требуемое количество дрожжевого экстракта для получения конечной концентрации 0,2 % мас./об. полученной среды точно взвешивают и растворяют в оставшейся части воды в отдельной конической колбе с ватным тампоном. Два раствора автоклавируют и смешивают в стерильных условиях, чтобы получить среду на основе SM. При необходимости добавляется стерильная вода для компенсации потери объема жидкости во время стерилизации. Конечная концентрация сахара в среде предпочтительно должна составлять 14-21 г/л, наиболее предпочтительно 17,5 г/л. В этом отношении общая концентрация сахара в используемой мелассе не является критической для изобретения при условии, что концентрация сахара в конечной среде находится в предпочтительных пределах. Кроме того, пропорция общего объема воды, необходимая для приготовления раствора глюкозы и дрожжевого экстракта, не является критической для настоящего изобретения, при условии, что желаемая концентрация каждого компонента достигается при смешивании двух растворов. Кроме того, среды на основе СМ могут быть дополнены витаминами и минералами. Необязательно, но меласса может быть предварительно обработана для удаления примесей и осахаривания. Кроме того, в процессе промышленного масштаба пеногаситель может быть добавлен к среде до и/или во время процесса ферментации. Кроме того, дрожжевой экстракт можно дешево получить из остаточных дрожжей и использовать для приготовления этой среды.

Приготовление дрожжевого экстракта из остаточных пивных дрожжей: Что касается приготовления среды на основе SM, описанной выше, дрожжевой экстракт может быть получен из коммерческих источников или, что более предпочтительно, дрожжевой экстракт может быть дешево получен из остаточных дрожжей после промышленной ферментации с *Saccharomyces cerevisiae*, где дрожжевая биомасса является побочным продуктом. Наиболее предпочтительны остаточные пивные дрожжи. Однако источник остаточных дрожжей для производства дрожжевого экстракта не является критическим для настоящего изобретения, при условии, что остаточные дрожжевые клетки не лишены основных компонентов, характерных для коммерческого дрожжевого экстракта, и при условии, что остаточные дрожжи не накапливают вещества, вредные для роста *Xanthophyllomyces dendrorhous*, биосинтеза астаксантина или здоровья человека и животных, например, таких как тяжелые металлы.

Для предварительной обработки остаточные дрожжи отделяли от оставшегося пива центрифугированием (4470×g в течение 10 мин). Осадок клеток несколько раз промывали дистиллированной водой до тех пор, пока надосадочная жидкость после центрифугирования не становилась прозрачной.

Метод 1. (Автолиз) Готовили клеточную суспензию, содержащую 40 г влажных остаточных клеток дрожжей в 400 мл дистиллированной воды. Для определения массы сухих клеток отбирали 5 мл суспензии. Затем pH оставшейся суспензии доводили до 6. Суспензию клеток распределяли по 13 коническим колбам с ватными пробками (вместимостью 250 мл) и инкубировали при 50°C при постоянном перемешивании при 150 об/мин в течение 24 часов. Через 24 часа суспензию объединяли и нагревали при 80° в течение 30 минут на магнитной мешалке, а затем охлаждали до комнатной температуры. Клеточный дебрис отделяли центрифугированием (4470×g в течение 10 мин). Водный экстракт обезвоживали с использованием вакуумного ротационного испарителя при 65°C. Высушенный экстракт взвешивали и затем хранили в герметичной таре для последующего использования. Определяли содержание общего белка, общего

содержания сахара, а также элементный анализ дрожжевого экстракта.

Метод 2 (Автоклавирование) Готовили суспензию клеток, содержащую 40 г влажных остаточных клеток дрожжей в 400 мл дистиллированной воды. Для определения массы сухих клеток отбирали 5 мл суспензии. Суспензию распределяли по 4 коническим колбам (вместимостью 1 л) и автоклавировали при 115°C в течение 10 мин. После охлаждения до комнатной температуры водный экстракт отделяли центрифугированием (4470×g, 10 мин) и обезвоживали с использованием вакуумного ротационного испарителя при 65°C. Высушенный экстракт взвешивали и затем хранили в герметичной таре для последующего использования. Определяли содержание общего белка, общего содержания сахара, а также элементный анализ дрожжевого экстракта.

Метод 3 (Ультразвуковая обработка) Готовили суспензию клеток, содержащую 40 г влажных остаточных клеток дрожжей в 400 мл дистиллированной воды. Для определения массы сухих клеток отбирали 5 мл суспензии. Суспензию подвергали ультразвуковой обработке (80 кГц, 100% мощность, 30-50°C) в течение 30 мин, по 200 мл за раз. После охлаждения до комнатной температуры водный экстракт отделяли центрифугированием (4470×g, 10 мин) и обезвоживали с использованием вакуумного ротационного испарителя при 65°C. Высушенный экстракт взвешивали и затем хранили в герметичной таре для последующего использования. Определяли содержание общего белка, общее содержания сахара, а также проводили элементный анализ дрожжевого экстракта.

Приготовление посевной культуры: две-три бактериологической петли свежевыращенного (возрастом менее 1 недели) штамма *Phaffia rhodozyma* на чашке с агаризованной средой (2% глюкозы, 1% пептона, 0,2% дрожжевого экстракта и 0,9% агара) суспендировали в стерильной дистиллированной воде. Один миллилитр этой клеточной суспензии использовали для инокуляции каждых 50 мл питательной среды (содержащей 2% глюкозы, 1% пептона и 0,2% дрожжевого экстракта) в конической колбе с ватно-марлевой пробкой. Затем полученную суспензию инкубировали на орбитальном шейкере в течение 48 часов при 18°C при постоянном освещении белым светом и перемешивании со скоростью 150 об/мин. Далее суспензия использовали как посевную культуру. Подготовка посевной культуры не обязательно ограничивается использованием YPG, ее можно получить путем ферментации на среде, приготовленной на основе SM.

Культивирование Phaffia rhodozyma и продукция астаксантина: Вышеупомянутую посевную культуру инокулировали в стерильную среду на основе SM при 10% об./об. Полученную культуру инкубировали при 12°C при постоянном освещении (белый свет) и перемешивании при 150 об/мин в течение 5-7 дней, предпочтительно 5 дней. В некоторых вариантах осуществления этот процесс повторяли со средой YPG для сравнения. В конце периода ферментации количественно определяли содержание астаксантина, сухую массу клеток и остаточный сахар в среде. В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения были использованы штаммы *Phaffia rhodozyma* Y1655, Y1654 и Y989, приобретенные во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов НИЦ «Курчатовский институт», г. Москва. Что касается настоящего изобретения, то условия культивирования (температура и свет) специфичны для этих штаммов. Различные штаммы *Phaffia rhodozyma* можно культивировать на средах на основе SM, раскрытых в настоящем изобретении, где используются условия культивирования, оптимальные для продукции астаксантина указанным штаммом (штаммами). В соответствии со способом по настоящему изобретению также могут быть использованы мутантные штаммы с повышенной продуктивностью астаксантина.

Количество остаточного сахара в конце периода ферментации должно составлять приблизительно менее 40% от исходной общей концентрации сахара, наиболее предпочтительно близко к нулю. Содержащая астаксантин биомасса *Phaffia rhodozyma*, полученная в соответствии с настоящим изобретением, может быть использована непосредственно, как клеточный концентрат, влажные клетки, сухие клетки и клеточный лизат. Также из полученной биомассы, может быть получен экстракт астаксантина или кристаллический астаксантин путем экстракции, очистки и т.п. Экстракцию астаксантина из биомассы Phaffia rhodozyma и/или ее очистку можно проводить с использованием любого метода, позволяющего эффективно и стабильно собирать каротиноид. Биомасса, продукты полученные на ее основе, экстракт астаксантина или очищенный астаксантин, полученные в соответствии с настоящим изобретением, могут быть использованы отдельно в качестве источника каротиноида или могут быть смешаны и использованы в заданных пропорциях.

Определение массы высушенных клеток. Клетки из 5 мл культурального бульона отделяли центрифугированием при 4470×g в течение 10 мин. Осадок клеток дважды промывали водой, каждый раз отделяя клетки центрифугированием при 4470×g в течение 10 мин, а затем сушили при 50°C в сушильном шкафу до постоянной массы.

Определение содержания сахара: аликвоту супернатанта культурального бульона после отделения клеток центрифугированием соответствующим образом разбавляли до 10 мл. Два миллилитра разведенного образца переносили в пробирку и смешивали с 50 мкл 80%-ного водного раствора фенола. Добавляли 5 мл концентрированной серной кислоты, направляя струю кислоты против поверхности жидкости, перемешивали и выдерживали в темноте 10 мин. Полученную смесь охлаждали в воде при 25°C в течение 10 минут и измеряли оптическую плотность на спектрофотометре при 487 нм относительно холостого опыта, при этом вместо образца использовали 2 мл дистиллированной воды. Остаточный сахар определяли количественно, используя калибровочную кривую для глюкозы, принимая во внимание фактор разбавления образца.

Определение содержания астаксантина. Клетки собирали из 10 мл культурального бульона центрифугированием при 4470×g в течение 10 мин с последующим центробежным промыванием клеточного осадка дважды водой. Клетки суспендировали в 2 мл диметилсульфоксида и помещали в ультразвуковую ванну при мощности 60 Вт на 15 мин для разрушения клеток. Полученную смесь экстрагировали в течение 5 мин петролейным эфиром (фракция 40-60). Органическую фазу, содержащую астаксантин, собирали после центрифугирования при 4470×g в течение 10 мин. процесс экстракции повторяли до тех пор, пока фаза петролейного эфира после центрифугирования не перестает быть окрашенной. Фазы петролейного эфира, содержащие астаксантин, объединяли и растворитель отгоняли на вакуумном ротационном испарителе. Экстракт растворяли в ацетонитриле и измеряли оптическую плотность на спектрофотометре при 478 нм относительно ацетонитрила в качестве контроля. Содержание астаксантина определяли количественно с помощью калибровочной кривой.

Вариант 1. Для этого эксперимента 100 мл посевной культуры штамма Y1655 *Phaffia rhodozyma* готовили в стерильной конической колбе на 250 мл с ватно-марлевой пробкой. Стерильные среды на основе SM, состоящие из 5% соевой мелассы (с общим содержанием сахара 35%) и 0,2% коммерческого дрожжевого экстракта, готовили, как описано выше. Полученная ферментационная среда содержала общий сахар 21 г/л. Три конические колбы по 250 мл с ватно-марлевыми пробками, содержащие по 100 мл питательной среды на основе соевой мелассы, инокулировали 10 мл 48-часовой посевной

культуры штамма Y1655 *Phaffia rhodozyma*, содержащей приблизительно 1,76×10^8 клеток на мл. Затем культуры инкубировали при 12°C при постоянном освещении (белый свет) и перемешивании при 150 об/мин в течение 5 дней. Для сравнения параллельно проводили аналогичный эксперимент со средой на основе глюкозы YPG, содержащей 2 % глюкозы, 1 % пептона и 0,2 % дрожжевого экстракта. В последний день ферментации количественно определяли содержание астаксантина, массу сухих клеток и остаточный сахар в среде. Количество астаксантина и биомассы, полученных с использованием среды на основе SM, составляло 1,92 мг/л и 6,32 г/л соответственно, что сравнимо с количеством, полученным с YPG, 2,12 мг/л и 6,24 г/л для астаксантина и биомассы соответственно.

Вариант 2. 100 мл посевной культуры штамма Y1655 *Phaffia rhodozyma* готовили в стерильной конической колбе с ватным тампоном объемом 250 мл. Стерильные среды на основе SM, состоящие из 0,2 % коммерческого дрожжевого экстракта и разной концентрации 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 % и 10 % соевой мелассы (с общим содержанием сахара 35 %). готовили, как описано выше. Полученная ферментационная среда содержала на литр общее количество сахара 10,5 г, 14 г, 17,5 г, 21 г, 24,5 г, 28 г, 31,5 г и 35 г соответственно. Для каждой среды на основе SM в три конические колбы на 250 мл с ватно-марлевыми пробками, каждая из которых содержала 100 мл среды, инокулировали 10 мл 48-часовой посевной культуры штамма Y1655 *Phaffia rhodozyma*, содержащей прибл. 1,5×10^8 клеток на мл. Затем культуры инкубировали при 12°C при постоянном освещении (белый свет) и перемешивании при 150 об/мин в течение 5 дней. Для сравнения параллельно проводили аналогичный эксперимент со средой на основе глюкозы YPG, содержащей 2 % глюкозы, 1 % пептона и 0,2 % дрожжевого экстракта. В последний день ферментации измеряли содержание астаксантина, сухую массу клеток, а также содержание остаточного сахара в средах. В таблице 1 показаны результаты.

Таблица 1.

Питательная среда	Вес сухой биомассы (г/л)	Концентрация астаксантина (мг/л)	Содержание астаксантина в биомассе (мг/г)	Остаточный сахар (г/л)
YPG	5.85	2.39	0.41	0.84
3% SM	4.85	1.44	0.30	4.45
4% SM	5.33	1.87	0.35	5.85
5% SM	6.21	2.05	0.33	7.21
6% SM	6.50	2.35	0.36	7.99
7% SM	6.91	2.50	0.36	9.37
8% SM	7.32	2.29	0.31	10.08
9% SM	8.15	2.50	0.31	11.86
10% SM	8.09	2.34	0.29	12.93

Вариант 3. Для этого эксперимента 100 мл посевной культуры штамма Y1655 *Phaffia rhodozyma* готовили в стерильной конической колбе на 250 мл с ватно-марлевой пробкой. Дрожжевой экстракт из остаточных пивных дрожжей готовили автолизом (А),

автоклавированием (B) или обработкой ультразвуком (C), как описано выше. Стерильные среды на основе SM, состоящие из 5% соевой мелассы (с общим содержанием сахара 35%) и 0,2% различных дрожжевых экстрактов из остаточных пивных дрожжей, приготовленных, как описано выше. Полученная питательная среда содержит 17,5 г/л общего сахара. Для каждой среды на основе SM в три конические колбы на 250 мл с ватно-марлевыми пробками, каждая из которых содержала 100 мл среды, инокулировали 10 мл 48-часовой посевной культуры штамма Y1655 *Phaffia rhodozyma*, содержащей прибл. 2,26×10^8 клеток на мл. Для сравнения аналогичный эксперимент с 5% средой на основе SM с использованием коммерческого дрожжевого экстракта (S). В последний день ферментации измеряли содержание астаксантина, массу сухих клеток, а также содержание остаточного сахара в средах. В таблице 2 показаны результаты.

Таблица 2.

Питательная среда	Вес сухой биомассы (г/л)	Концентрация астаксантина (мг/л)	Содержание астаксантина в биомассе (мг/г)	Остаточный сахар (г/л)
A	6.89	1.71	0.25	5.72
B	6.51	1.68	0.26	6.04
C	6.95	1.70	0.24	5.99
S	6.78	1.72	0.25	6.39

Вариант 4. Для этого эксперимента 100 мл посевной культуры штаммов Y1655, Y1654 и Y989 *Phaffia rhodozyma* готовили отдельно в стерильной конической колбе с ватным тампоном на 250 мл. Стерильные среды на основе CM, состоящие из 5% соевой мелассы (с общим содержанием сахара 35%) и 0,2% различных дрожжевых экстрактов из остаточных пивных дрожжей (полученных путем автолиза), готовили, как описано выше. Полученная ферментационная среда содержит общий сахар 17,5 г/л. Для каждого штамма в три 250-мл конических колбы с ватными пробками, каждая из которых содержала 100 мл среды, инокулировали 10 мл 48-часовой посевной культуры, содержащей прибл. 1,01×10^8 клеток/мл (для штамма Y1655), 1,0×10^8 клеток/мл (для штамма Y1654) и 1,25×10^8 клеток/мл (для штамма Y989). Для сравнения аналогичный эксперимент с 5% средой на основе CM с использованием коммерческого дрожжевого экстракта. Содержание астаксантина, массу сухих клеток, а также содержание остаточного сахара в средах определяли в последний день ферментации. В таблице 3 показаны результаты.

Таблица 3.

Штамм	Питательная среда	Вес сухой биомассы (г/л)	Концентрация астаксантина (мг/л)	Содержание астаксантина в биомассе (мг/г)	Остаточный сахар (г/л)
Y989	YPG	5.29	1.82	0.35	0.76
	SM	7.08	2.07	0.29	6.13
Y1654	YPG	5.19	2.02	0.39	0.68
	SM	6.24	2.17	0.35	6.38
Y1655	YPG	4.93	1.86	0.38	0.70
	SM	5.97	1.95	0.33	6.03

(57) Формула изобретения

Способ приготовления питательной среды для культивирования дрожжей, продуцирующих астаксантин, *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*) на основе отходов пищевых производств, отличающийся тем, что в качестве источника углерода используют соевую мелассу с известным содержанием сахаров, добавленную в количестве, обеспечивающем общее содержание сахаров в питательной среде 14–21 г/л, наиболее предпочтительно 17,5 г/л, и источник азота в виде дрожжевого экстракта коммерческого или приготовленного из остаточных пивоваренных дрожжей методом автолиза, автоклавирования или ультразвуковой обработкой с последующим определением содержания сухих веществ, добавленного в количестве, обеспечивающем содержание 2±0.2 г сухих веществ дрожжевого экстракта на литр питательной среды.