



(51) МПК  
*C12N* 1/16 (2006.01)  
*C12M* 1/00 (2006.01)  
*A23K* 1/00 (2006.01)

**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ**

(21)(22) Заявка: 2011110739/10, 22.03.2011

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
 22.03.2011

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 22.03.2011

(43) Дата публикации заявки: 27.09.2012 Бюл. № 27

(45) Опубликовано: 27.09.2014 Бюл. № 27

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: US 20050124032 A1, 09.06.2005. RU 2385925 C1, 10.04.2010. RU 2410419 C1, 27.01.2011. RU 2384612 C2, 20.03.2010. Каталог ВКПМ. Штамм дрожжей *Phaffia rhodozyma* ВКПМ У-2228. Найдено в Интернете: [http://www.genetika.ru/vkpm/katalog-mikroorganizmov/group\\_906/group\\_1059/group\\_1060/item\\_4069/](http://www.genetika.ru/vkpm/katalog-mikroorganizmov/group_906/group_1059/group_1060/item_4069/)

Адрес для переписки:

141700, Московская обл., г. Долгопрудный,  
 Институтский пер., 9А, ООО  
 "ФБТ", В.А. Каменеву.

(72) Автор(ы):

Герман Людмила Сергеевна (RU),  
 Вустин Михаил Михайлович (RU),  
 Жаворонков Владимир Александрович (RU),  
 Захаров Захар Викторович (RU),  
 Каменев Евгений Александрович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Общество с ограниченной ответственностью  
 "ФБТ" (RU)

**(54) СПОСОБ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ДРОЖЖЕЙ PHAFFIA RHODOZYMA ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ КОРМОВОЙ ДОБАВКИ, СОДЕРЖАЩЕЙ АСТАКСАНТИН**

(57) Реферат:

Способ культивирования дрожжей *Phaffia rhodozyma* для получения кормовой добавки, содержащей астаксантин, предусматривает приготовление культуры дрожжей на твердой агаризованной среде, выращивают посевной материал на качалке в колбах. Посевной материал переносят в основную питательную среду, содержащую ростовой фактор, соли аммония, магния, натрия, калий фосфорнокислый. При этом выращивание культуры дрожжей на агаризованной среде, посевной и ферментационной среде ведут с циклическим освещением, где время цикла составляет 2-5 ч и время освещения за один цикл 3-10 мин.

Источником углеводов в среде является ферментализат крахмала из некондиционного зерна в количестве 5-8% по глюкозе, полученный дроблением некондиционного зерна гидро-механоакустическим способом с последующим разделением на фракции и двухступенчатым ферментализом выделенной крахмальной фракции. В качестве ростового фактора используют кукурузный экстракт в количестве 5-8%. Культивирование осуществляют в фотобиореакторе с внутренним светоподводом. Способ позволяет получить биомассу дрожжей с содержанием сырого протеина до 58,3%, астаксантина - до 55,2 мг/л. 4 пр.



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

*C12N* 1/16 (2006.01)*C12M* 1/00 (2006.01)*A23K* 1/00 (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: 2011110739/10, 22.03.2011

(24) Effective date for property rights:  
22.03.2011

Priority:

(22) Date of filing: 22.03.2011

(43) Application published: 27.09.2012 Bull. № 27

(45) Date of publication: 27.09.2014 Bull. № 27

Mail address:

141700, Moskovskaja obl., g. Dolgoprudnyj,  
Institutskij per., 9A, OOO "FBT", V.A. Kamenevu.

(72) Inventor(s):

**German Ljudmila Sergeevna (RU),  
Vustin Mikhail Mikhajlovich (RU),  
Zhavoronkov Vladimir Aleksandrovich (RU),  
Zakharov Zakhar Viktorovich (RU),  
Kamenev Evgenij Aleksandrovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Obshchestvo s ogranichennoj otvetstvennost'ju  
"FBT" (RU)**(54) **METHOD OF CULTIVATING PHAFFIA RHODOZYMA YEASTS FOR OBTAINING ASTAXANTHIN-CONTAINING FORAGE ADDITIVE**

(57) Abstract:

FIELD: chemistry.

SUBSTANCE: method of cultivating *Phaffia rhodozyma* yeasts to obtain axanthin-containing forage additive includes preparation of yeasts culture on solid agarised medium, growth of inoculum on rocker in flasks. Inoculum is transferred on basic nutritional medium, which contains growth factor, salts of ammonium, magnesium, sodium, potassium phosphate. Growing yeasts culture on agarised medium, inoculation and fermentation medium is carried out with cyclic illumination, where cycle time constitutes 2-5 h and illumination time for one cycle constitutes 3-10 min.

Source of carbohydrates in medium is represented by starch ferment lysate from substandard grain in amount 5-8% by glucose, obtained by crushing substandard grain by hydro-mechanoacoustic method with further separation into fractions and two-step fermentolysis of separated starch fraction. As growth factor used is corn extract in amount 5-8%. Cultivation is performed in photobioreactor with internal light supply.

EFFECT: obtaining yeasts biomass with content of raw protein to 58,3%, axanthin - to 55,2 mg/l.

4 ex

RU 2 529 715 C 2

RU 2 529 715 C 2

Изобретение относится к области биотехнологии и может быть использовано для получения белковой добавки, содержащей каротиноид астаксантин.

Из-за своей высокой антиоксидантной способности астаксантин сегодня называют «супер-антиоксидантом». Он сильнее витамина Е в 500 раз. Его используют для поддержания иммунитета человека, с/х животных, птиц, рыб, для окраса мяса рыб в красный цвет, окраса желтка куриных яиц.

На территории России в настоящее время нет способа получения астаксантина и белково-витаминной добавки с содержанием астаксантина в промышленных масштабах.

Известны способы получения каротиноида астаксантина синтетическим способом (патент США №7,247,752 В2).

Недостаток синтетического астаксантина заключается в том, что количество всасываемого препарата максимум 50% из-за присутствия не только L-, но и D-оптической формы астаксантина; в препарате из синтетического астаксантина присутствуют различные изомеры и другие продукты синтеза.

Известен способ получения астаксантина, описанный в патенте США №6,022,701 (2000 г.). В качестве продуцента астаксантина используется водоросль *Haematococcus pluvialis*.

Недостаток данного способа заключается в том, что для культивирования микроводоросли *Haematococcus pluvialis* необходима среда, содержащая дорогостоящие компоненты. Кроме этого для своей жизнедеятельности микроводоросли нуждаются в постоянном освещении, что увеличивает энергозатраты при искусственном культивировании. А скорость роста микроводоросли значительно ниже, чем у дрожжей.

Известен способ получения астаксантина, описанный в патенте США №6,413,736 В1, в котором предлагается использовать различные штаммы дрожжей *Phaffia rhodozyma* в качестве продуцентов каротиноида астаксантина.

Недостатком данного способа является использование в качестве источника углерода в питательных средах технической глюкозы, в качестве ростового фактора - дорогостоящих дрожжевого экстракта и/или пептона. В состав питательной среды включаются витамины и минералы. В процессе культивирования клеток дрожжей *Ph. rhodozyma* глюкоза в качестве источника углерода частично заменяется глицерином.

В патенте также предложено установить одно или несколько прозрачных отверстий для подачи через них энергии света в культуральную жидкость либо пропускать с помощью насоса культуральную жидкость через светопроницаемую трубу и возвращать в ферментер. К недостаткам данного способа относятся высокие затраты электроэнергии на освещение из-за низкой эффективности светоподвода.

Наиболее близким к предлагаемому способу культивирования является способ, описанный в патенте США №2005/0124032 А1, в котором предложен способ культивирования клеток дрожжей *Phaffia rhodozyma* с циклическим освещением в 6 часов (ультрафиолетовый свет/темнота). В состав питательной среды входит глюкоза (источник углерода), дрожжевой экстракт и мука семян хлопка (источники азота), витамины биотин, тиамин, пантотенат кальция, соли  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{CaCO}_3$ . Культивирование проводилось при температуре 17-20°C. Применялся цикл ультрафиолетовое освещение/темнота с периодичностью 6 часов.

Недостаток данного способа заключается в том, что предложенная периодичность не позволяет экономить значительное количество энергии на освещение.

Задачей настоящего изобретения является получение продукта высокого качества, содержащего астаксантин и белково-витаминный комплекс, путем культивирования

биомассы дрожжей *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrorhous*) с содержанием сырого протеина не менее 43% и астаксантина не менее 0,4 мг/г АСБ на основе питательных сред, содержащих ферментолит крахмала, полученный дроблением некондиционного зерна с последующим разделением на фракции (патент №2410419) в качестве источника углерода, источник ростовых факторов, содержащий белок и аминокислоты (не менее 25%, например, кукурузный экстракт), в качестве источника органического азота и неорганический азот в виде аммония серноокислого с применением в качестве ферментера фотобиореактора с внутренним светоподводом (расположение осветительного устройства внутри ферментера), обеспечивающего интенсивный подвод световой энергии, воздуха, питательных веществ.

Поставленная задача достигается следующим путем:

- в качестве источника углеводов используется ферментолит крахмала в количестве 5-8% по глюкозе;
- ферментолит крахмала получают дроблением некондиционного зерна гидро-механоакустическим способом с последующим разделением на фракции и двухступенчатым ферментолитом выделенной крахмальной фракции;
- в качестве ростового фактора используется отход крахмалопаточного производства - кукурузный экстракт, содержащий белок и аминокислоты не менее 25%, в количестве 5-8%.
- процесс выращивания культуры, начиная с твердой питательной среды на скошенном агаре, посевного материала и культивирования дрожжей ведется с периодическим освещением 3-10 минут каждые 2-5 часов;
- в качестве ферментера для культивирования используется аппарат фотобиореактор с внутренним светоподводом (например, описанный в статье Suh I.S. & Lee S.B. Cultivation of a cyanobacterium in an internally radiating air-lift photobioreactor / Journal of Applied Phycology 13, 2001 стр.383, или в статье Carvalho A.P., Meireles L.A., Malcata F.X. Microalgal reactors: a review of enclosed system designs and performances / Biotechnol. Prog. 2006, 22 стр.1496, или в автореферате Гладышева П.А. Разработка фотобиореакторов для замкнутых экологических систем жизнеобеспечения стр.4 и другие), который позволяет минимизировать расход электроэнергии за счет эффективного светоподвода, а также обеспечивает требуемые культуре аэрацию, рН, температуру, концентрацию питательных веществ.

Сущность изобретения подтверждается, но не исчерпывается приведенными ниже примерами.

#### Пример 1

Ферментацию проводят в ферментере емкостью 3 л, снабженном системами регулирования температуры, аэрации, перемешивания, рН, парциального давления растворенного кислорода. Процесс периодический.

Начальные условия перемешивания и аэрации обеспечивают скорость массопередачи кислорода 5-6 г O<sub>2</sub>/л\*час.

Штамм клеток дрожжей *Phaffia rhodozyma* ВКПМ У-2228, выращенный на агаризованной среде, содержащей ферментолит крахмала, кукурузный экстракт и соли, при 20°C в течение четырех суток, переносят в посевные колбы со стерильной питательной средой следующего состава (г/л):

- Ферментолит крахмала по глюкозе - 20
- Кукурузный экстракт - 30
- Аммоний серноокислый - 1
- Натрий хлористый - 0,5

Магний серноокислый 7-водный - 0,5

Калий фосфорнокислый двузамещенный - 0,5

При температуре 20°C выращивают на качалке в колбах в течение 44-48 часов.

5 Посевной материал из колб в количестве 10% от начального объема ферментационной среды переносят в подготовленный соответствующим образом рабочий фотобиореактор, емкостью 3 л, предварительно заполненный 2,5 л стерильной питательной среды следующего состава (г/л):

Ферментализат крахмала по глюкозе - 80

Кукурузный экстракт - 50

10 Аммоний серноокислый - 2

Натрий хлористый - 1

Магний серноокислый 7-водный - 1

Калий фосфорнокислый двузамещенный - 1

Пенегаситель Пропиол Б-400 - 0,1

15 Засев аппарата производят при начальном значении рН 4,5-4,7.

Культивирование в основном аппарате ведется в течение 66-72 часов. Используется циклическое освещение с периодичностью 2 часа и длительностью освещения культуральной жидкости (КЖ) 3 минуты за цикл.

20 Общий слив за 66-72 часа - 2,4 л с концентрацией биомассы 26,0 г/л, содержащей 44,6% сырого протеина (в пересчете на абсолютно сухое вещество), и астаксантина 30,5 мг/л.

Пример 2

25 Ферментацию проводят в ферментере емкостью 3 л, снабженном системами регулирования температуры, аэрации, перемешивания, рН, парциального давления растворенного кислорода. Процесс периодический.

Начальные условия перемешивания и аэрации обеспечивают скорость массопередачи кислорода 5-6 г O<sub>2</sub>/л\*час.

30 Штамм клеток дрожжей *Phaffia rhodozyma* ВКПМ Y-2228, выращенный на агаризованной среде, содержащей ферментализат крахмала, кукурузный экстракт и соли, при 20°C в течение четырех суток, переносят в посевные колбы со стерильной питательной средой следующего состава (г/л):

Ферментализат крахмала по глюкозе - 20

Кукурузный экстракт - 30

Аммоний серноокислый - 1

35 Натрий хлористый - 0,5

Магний серноокислый 7-водный - 0,5

Калий фосфорнокислый двузамещенный - 0,5

При температуре 20°C выращивают на качалке в колбах в течение 44-48 часов.

40 Посевной материал из колб в количестве 10% от начального объема ферментационной среды переносят в подготовленный соответствующим образом рабочий фотобиореактор, емкостью 3 л, предварительно заполненный 2,5 л стерильной питательной среды следующего состава (г/л):

Ферментализат крахмала по глюкозе - 50

Кукурузный экстракт - 80

45 Аммоний серноокислый - 16

Натрий хлористый - 1

Магний серноокислый 7-водный - 1

Калий фосфорнокислый двузамещенный - 1

Пеногаситель Пропинол Б-400 - 0,1

Засев аппарата производят при начальном значении рН 4,5-4,7.

Культивирование в основном аппарате ведется в течение 66-72 часов. Используется циклическое освещение с периодичностью 5 часов и длительностью освещения культуральной жидкости (КЖ) 10 минуты за цикл.

Общий слив за 66-72 часа - 2,4 л с концентрацией биомассы 34,3 г/л, содержащей 58,3% сырого протеина (в пересчете на абсолютно сухое вещество), и астаксантина 19,3 мг/л.

Пример 3

Ферментацию проводят в фотобиореакторе емкостью 3 л, снабженном системами регулирования температуры, аэрации, перемешивания, рН, парциального давления растворенного кислорода. Процесс периодический.

Начальные условия перемешивания и аэрации обеспечивают скорость массопередачи кислорода 5-6 г O<sub>2</sub>/л\*час.

Штамм клеток дрожжей *Phaffia rhodozyma* ВКПМ У-2238, выращенный на агаризованной среде, содержащей ферментолизат крахмала, кукурузный экстракт и соли, при 20°C в течение семи суток, переносят в посевные колбы со стерильной питательной средой следующего состава (г/л):

Ферментолизат крахмала по глюкозе - 20

Кукурузный экстракт - 30

Аммоний сернокислый - 1

Натрий хлористый - 0,5

Магний сернокислый 7-водный - 0,5

Калий фосфорнокислый двузамещенный - 0,5

При температуре 20°C выращивают на качалке в колбах в течение 44-48 часов.

Посевной материал из колб в количестве 10% от начального объема ферментационной среды переносят в подготовленный соответствующим образом рабочий фотобиореактор, емкостью 5 л, предварительно заполненный 2,7 л стерильной питательной среды следующего состава (г/л):

Ферментолизат крахмала по глюкозе - 50

Кукурузный экстракт - 80

Аммоний сернокислый - 16

Натрий хлористый - 1

Магний сернокислый 7-водный - 1

Калий фосфорнокислый двузамещенный - 1

Пенегаситель Пропинол Б-400 - 0,1

Засев аппарата производят при начальном значении рН 4,5-4,7.

Культивирование в основном аппарате ведется в течение 66-72 часов. Используется циклическое освещение с периодичностью 5 часов и длительностью освещения культуральной жидкости (КЖ) 10 минут за цикл.

Общий слив за 66-72 часа - 2,4 л с концентрацией биомассы 36,7 г/л, содержащей 56,4% сырого протеина (в пересчете на абсолютно сухое вещество), и астаксантина 22,0 мг/л.

Пример 4

Ферментацию проводят в ферментере емкостью 3 л, снабженном системами регулирования температуры, аэрации, перемешивания, рН, парциального давления растворенного кислорода. Процесс периодический.

Начальные условия перемешивания и аэрации обеспечивают скорость массопередачи

кислорода 5-6 г O<sub>2</sub>/л\*час.

Штамм клеток дрожжей *Phaffia rhodozyma* ВКПМ У-2342, выращенный на агаризованной среде, содержащей ферментолизат крахмала, кукурузный экстракт и соли, при 20°C в течение семи суток, переносят в посевные колбы со стерильной

5 питательной средой следующего состава (г/л):

Ферментолизат крахмала по глюкозе - 20

Кукурузный экстракт - 30

Аммоний сернокислый - 1

Натрий хлористый - 0,5

10 Магний сернокислый 7-водный - 0,5

Калий фосфорнокислый двузамещенный - 0,5

При температуре 20°C выращивают на качалке в колбах в течение 44-48 часов.

Посевной материал из колб в количестве 10% от начального объема ферментационной среды переносят в подготовленный соответствующим образом рабочий фотобиореактор,

15 емкостью 5 л, предварительно заполненный 2,7 л стерильной питательной среды следующего состава (г/л):

Ферментолизат крахмала по глюкозе - 80

Кукурузный экстракт - 50

Аммоний сернокислый - 2

20 Натрий хлористый - 1

Магний сернокислый 7-водный - 1

Калий фосфорнокислый двузамещенный - 1

Пенегаситель Пропинол Б-400 - 0,1

Засев аппарата производят при начальном значении рН 4,5-4,7.

25 Культивирование в основном аппарате ведется в течение 66-72 часов. Используется циклическое освещение с периодичностью 2 часа и длительностью освещения культуральной жидкости (КЖ) 3 минуты за цикл.

Общий слив за 66-72 часа - 2,4 л с концентрацией биомассы 28,7 г/л, содержащей

30 мг/л.

Предлагаемый способ культивирования позволяет: решить проблему утилизации некондиционного зерна и получить ценный продукт, по качеству не уступающий зарубежным образцам; сократить время культивирования микроорганизмов по сравнению с существующими способами; снизить затраты на компоненты питательной

35 среды за счет использования в качестве источника углеводов ферментолизата крахмала в количестве 5-8% по глюкозе и в качестве ростового фактора отхода

крахмалопаточного производства - кукурузный экстракт в количестве 5-8%;

40 ферментолизат крахмала получают дроблением некондиционного зерна гидромехано-акустическим способом с последующим разделением на фракции и двухступенчатым ферментолизом выделенной крахмальной фракции.

Предлагаемый способ позволяет сократить время подачи световой энергии в процессе выращивания культуры, начиная с твердой питательной среды на скошенном агаре, посевного материала и культивирования дрожжей ведется с периодическим освещением

3-10 минут каждые 2-5 часов.

45 Использование в качестве ферментера для культивирования фотобиореактора с внутренним светоподводом позволяет повысить эффективность использования световой энергии и снизить энергозатраты на освещение культуральной жидкости. Аппарат обеспечивает требуемые культуре аэрацию, рН, температуру, концентрацию питательных

веществ.

#### Формула изобретения

Способ культивирования дрожжей *Phaffia rhodozyma* для получения кормовой добавки, содержащей астаксантин, состоящий в том, что готовят культуру дрожжей на твердой агаризованной среде, выращивают посевной материал на качалке в колбах, посевной материал переносят в основную питательную среду, содержащую ростовой фактор, соли аммония, магния, натрия, калий фосфорнокислый, и ведут процесс культивирования периодическим способом, отличающийся тем, что выращивание культуры дрожжей на агаризованной среде, посевной и ферментационной среде ведут с циклическим освещением, где время цикла 2-5 ч и время освещения за один цикл 3-10 мин; источником углеводов является ферментолитат крахмала из некондиционного зерна в количестве 5-8% по глюкозе; ферментолитат крахмала получают дроблением некондиционного зерна гидромеханоакустическим способом с последующим разделением на фракции и двухступенчатым ферментолитом выделенной крахмальной фракции; в качестве ростового фактора используют кукурузный экстракт в количестве 5-8%; в качестве основного аппарата используют фотобиореактор с внутренним светоподводом.

20

25

30

35

40

45