

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202290426 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.06.01

(51) Int. Cl. C12P 23/00 (2006.01)
C12P 5/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.08.03

(54) СПОСОБ ФЕРМЕНТАЦИИ β -КАРОТИНА

(31) 62/881,789

(32) 2019.08.01

(33) US

(86) PCT/EP2020/071767

(87) WO 2021/019101 2021.02.04

(71) Заявитель:
ДСМ АйПи АССЕТС Б.В. (NL)

(72) Изобретатель:
Ройер Джон, Стрикер Эмили Дэвис,
Иттерли Уоррен Нельсон (CH)

(74) Представитель:
Фелицына С.Б. (RU)

(57) Данное изобретение относится к биотехнологическому получению каротиноидов, в частности к способам повышения титра и чистоты β -каротина, образующегося в результате ферментации в пригодных клетках-хозяевах.

202290426

A1

A1

202290426

СПОСОБ ФЕРМЕНТАЦИИ β -КАРОТИНА

Данное изобретение относится к биотехнологическому получению каротиноидов, в частности к способам повышения титра и чистоты β -каротина, получаемого путем ферментации в пригодных для этого клетках-хозяевах.

Для промышленного производства каротиноидов, например ликопина или β -каротина, применяются как химический синтез, так и биотехнологические методы. В природе каротиноиды образуются в определенных бактериях, грибах и фотосинтезирующих организмах. Путем химического синтеза β -каротин получается только в полностью транс-конфигурации, тогда как природный β -каротин представлен различными конфигурациями: полностью транс, моно-цис, ди-цис и поли-цис. Для биотехнологического получения β -каротина в качестве клеток-хозяев чаще всего используются клетки водорослей, например, *Dunaliella salina* или *Haematococcus pluvialis*, и грибов, например, *Blakeslea trispora* [см., например обзор в работе Mussagy et al., Appl Microbiol Biotechnol 103:1095-1114 (2019)].

Чтобы увеличить продуктивность и подавить образование примесей, например 7,8-дигидро- β -каротина, в биотехнологических системах получения β -каротина ферментацию проводят с добавлением антибиотиков, например, изониазида.

Хотя механизм действия изониазида при ферментации с образованием β -каротина неизвестен, в других случаях установлено, что этот антибиотик ингибирует синтазы жирных кислот (Slayden et al., Mol. Microbiol, 38, p.514-525, 2000), а также ферменты семейства цитохрома P450 (Desta et al., Antimicrob. Agents Chemother., Vol. 45, No 2, p. 382-392, 2001).

Использование антибиотиков, в том числе изониазида, в промышленных масштабах вызывает критику, так оно может способствовать выработке у бактерий устойчивости к антибиотикам; поэтому в процессах биотехнологического производства его следует сводить к минимуму.

Таким образом, существует потребность в выявлении новых природных соединений, способных эффективно заменить изониазид при производстве каротиноидов путем ферментации в пригодных для этого клетках-хозяевах, например в *Blakeslea trispora*.

Мы обнаружили, что если получать β -каротин путем ферментации в пригодных клетках-хозяевах, продуцирующих каротиноиды, например в *Blakeslea trispora*, в присутствии куркумина, то образование β -каротина стимулируется и одновременно уменьшается количество примесей, в частности, например, снижается процентное

содержание 7,8-дигидро- β -каротина.

В частности, данное изобретение относится к способу ферментативного получения каротиноидов в клетках-хозяевах, продуцирующих каротиноиды, например в клетках *B. trispora*, в котором ферментация осуществляется в присутствии эффективного количества куркумина, что достигается, например, путем добавления куркумина в процессе ферментации, предпочтительно в концентрации менее около 1,0% (масса/объем).

В одном из своих аспектов данное изобретение относится к способу получения каротиноидов в клетках-хозяевах, продуцирующих каротиноиды, например в клетках *B. trispora*, в присутствии эффективного количества куркумина, добавляемого в процессе ферментации, в частности позволяющему увеличить продукцию β -каротина по меньшей мере на около 12% по сравнению с ферментацией без добавления куркумина. Увеличение количества получаемого β -каротина может достигать предпочтительно более чем около 220%, например при ферментации в присутствии куркумина в концентрации около 0,3%.

В частности, способ по данному изобретению для ферментативного получения каротиноидов в клетках-хозяевах, продуцирующих каротиноиды, например в клетках *B. trispora*, осуществляется в присутствии в процессе ферментации куркумина в концентрации около 0,01-1,0% (масса/объем), предпочтительно от около 0,03% до около 1,0% (масса/объем), например в диапазоне от около 0,03% до около 0,05 (масса/объем), что особенно ценно при использовании ферментеров для крупно- или среднемасштабного производства, например в присутствии куркумина в концентрации около 0,01; 0,02; 0,03; 0,04; 0,05; 0,06; 0,07; 0,08; 0,09; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9 или 1,0% (масса/объем); при этом прирост количества получаемого β -каротина (г/л) составляет от около 12% до более чем 220% по сравнению с ферментацией без куркумина. Более предпочтительно проводить ферментацию в присутствии куркумина в концентрации от около 0,3% до около 1,0% (масса/объем).

В другом своем аспекте данное изобретение относится к способу получения каротиноидов в клетках-хозяевах, продуцирующих каротиноиды, например в клетках *B. trispora*, в котором образование примесей, например 7,8-дигидро- β -каротин, в процессе ферментации сокращается, в частности процентное содержание 7,8-дигидро- β -каротина относительно суммарного количества каротиноидов, образующихся в результате ферментации, составляет около 7% или меньше, например количество указанной примеси снижается по меньшей мере на 28% по сравнению с ферментацией без куркумина. Снижение

относительного (относительно суммарного количества образующихся каротиноидов) количества 7,8-дигидро- β -каротина может составлять около почти 70%, например около 68%, то есть в процессе ферментации 7,8-дигидро- β -каротина образуется на около 70% меньше, что достигается добавлением при ферментации куркумина в концентрации, в частности, около 1,0% (масса/объем).

Предпочтительно способ по данному изобретению для получения каротиноидов путем ферментации в клетках-хозяевах, продуцирующих каротиноиды, например в клетках *B. trispora*, предполагает проведение ферментации в присутствии около 0,01–1,0% (масса/объем) куркумина, предпочтительно около 0,03–1,0% (масса/объем), например около 0,01; 0,02; 0,03; 0,04; 0,05; 0,06; 0,07; 0,08; 0,09; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9 или 1,0%, при этом процентное содержание 7,8-дигидро- β -каротина относительно суммарного количества каротиноидов в присутствии куркумина снижается до около 7–3%, тогда как без куркумина оно составляет около 9,7%. Более предпочтительно, когда проведение ферментации по данному изобретению в присутствии около 0,3–1,0% куркумина приводит к максимальному снижению содержания 7,8-дигидро- β -каротина, то есть до около 3% 7,8-дигидро- β -каротина относительно суммарного количества каротиноидов.

Таким образом, данное изобретение относится к способу снижения количества примесей при получении каротиноидов в клетках-хозяевах, продуцирующих эти соединения, например в клетках *B. trispora*, в частности снижения содержания примесного 7,8-дигидро- β -каротина при получении β -каротина путем ферментации, причем указанный способ включает добавление эффективного количества куркумина в процессе ферментации, в частности куркумин присутствует при ферментации в концентрации около 1% (масса/объем) или меньше, конкретнее – в концентрации от около 0,3% до около 1,0% (масса/объем).

В другом своем воплощении данное изобретение относится к способу повышения процентного содержания β -каротина при получении каротиноидов в клетках-хозяевах, продуцирующих эти соединения, например в клетках *B. trispora*, включающему добавление эффективного количества куркумина в процессе ферментации, в частности куркумин присутствует при ферментации в концентрации около 1% (масса/объем) или меньше, и при этом процентное содержание β -каротина относительно суммарного количества каротиноидов увеличивается на около 3–11% по сравнению с ферментацией без куркумина.

В одном из аспектов данного изобретения предлагается способ для получения каротиноидов в клетках-хозяевах, продуцирующих эти соединения, например в клетках *B.*

trispota, при котором увеличивается процентное содержание β -каротина относительно суммарного количества каротиноидов, в частности процентное содержание β -каротина относительно суммарного количества каротиноидов, возрастает до более 90%, например до 92%, по сравнению с ферментацией без куркумина; предпочтительно при добавлении в процессе ферментации куркумина в концентрации, например, 1,0% процентное содержание β -каротина составляет от около 86% до около 92%, по сравнению с 83% при ферментации без куркумина.

В другом предпочтительном воплощении данного изобретения процесс ферментации в присутствии 0,3% куркумина приводит к тому, что процентное содержание получаемого β -каротина относительно суммарного количества каротиноидов составляет 91%, что на около 10% больше, чем при ферментации без куркумина. Этот эффект превышает таковой от добавления при ферментации изониазида в концентрации 0,28 г/л, в результате чего относительное количество β -каротина возрастает менее чем на 10% по сравнению с ферментацией без изониазида.

В одном из конкретных воплощений данного изобретения описанное в настоящем документе получение каротиноидов в клетках-хозяевах, продуцирующих эти соединения, например в клетках *B. trispota*, проводится без добавления антибиотиков в процессе ферментации, в частности без изониазида.

В настоящем документе формулировка «1,0% (масса/объем)» означает 1% от массы ферментационной среды.

В контексте данного изобретения формулировка «эффективное количество куркумина» означает концентрацию по меньшей мере 0,01%; например, от около 0,01% до около 1% и более, предпочтительно около 0,01; 0,02; 0,03; 0,04; 0,05; 0,06; 0,07; 0,08; 0,09; 0,1; 0,2; 0,25; 0,3; 0,35; 0,4; 0,45; 0,5; 0,55; 0,6; 0,65; 0,7; 0,75; 0,8; 0,85; 0,9; 0,95; 1,0 или более. В частности, в экспериментах со встряхиваемыми колбами эффективное количество куркумина составляет от около 0,1% до около 1,0%. В частности, применительно к ферментерам для производства в крупных или средних масштабах эффективное количество куркумина составляет от около 0,01% до около 0,05%.

Куркумин, используемый, как описано в настоящем документе, в эффективном количестве, должен происходить из корней куркумы длинной (*Curcuma longa*) в молотом виде, содержащих куркуминоиды, из которых основным является куркумин. Эта субстанция включает (не ограничиваясь указанным здесь) собственно куркумин или его производные,

например деметоксикуркумин и бисдеметоксикуркумин. Из растительного материала может быть получен куркумин 95%-ной чистоты; в олеосмоле из куркумы он присутствует в относительном количестве 37-55%, в разбавленных олеосмолах – 6-15%; в продаже имеются эти и другие формы от разных производителей под регистрационным номером 458-37-7 по реестру Chemical Abstracts Service.(CAS).

В настоящем документе термин «примеси» включает, не ограничиваясь перечисленным здесь, 7,8-дигидро-β-каротин, γ-каротин и *цис*-β-каротин, в частности 7,8-дигидро-β-каротин.

Клетки, пригодные для использования в качестве клеток-хозяев по данному изобретению, включают клетки микроорганизмов, способных к биосинтезу каротиноидов и выбираемых из бактерий, водорослей и грибов, в частности дрожжей, например представителей родов *Escherichia*, *Streptomyces*, *Pantoea* (*Erwinia*), *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Synechococcus*, *Lactobacillus*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Mixococcus*, *Brevibacterium*, *Bradyrhizobium*, *Gordonia*, *Dietzia*, *Muricauda*, *Sphingomonas*, *Synochocystis*, *Paracoccus*, *Saccharomyces*, *Aspergillus*, *Pichia*, *Hansenula*, *Yarrowia*, *Phycomyces*, *Mucor*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*, *Xanthophyllomyces*, *Phaffia*, *Blakeslea*, *Haematococcus*, *Chlorella*, *Dunaliella*, *Neosporangium*, *Chlamydomonas*, *Murielopsis* или *Scenedesmus*, например выбираемых из видов *Escherichia coli*, *Paracoccus xeaxanthinifaciens*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger*, *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha*, *Phycomyces blakesleanus*, *Blakeslea trispora*, *Yarrowia lipolytica* или *Dunaliella salina*. Предпочтительно клетки-хозяева выбирают из природных продуцентов каротиноидов, включая *Dunaliella salina*, *Haematococcus pluvialis*, *Rhodospiridium*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*, *Sporidiobolus*, *Paracoccus*, *Fusarium sporotrichioides*, *Phycomyces blakesleanus*, *Mucor circinelliioides*, *Blakeslea*; наиболее предпочтительны клетки *B. trispora*.

В контексте данного изобретения важно учитывать, что для некоторых видов живых организмов, например микроорганизмов, грибов, водорослей или растений нередко имеются более одного названия – синонимические или устаревшие и современные; такие синонимы и базонимы, относящиеся к одному и тому же виду, характеризующемуся определенными физиологическими свойствами, определяются Международным кодексом номенклатуры прокариотических организмов или Международным кодексом номенклатуры водорослей, грибов и растений (Мельбурнским кодексом ботанической номенклатуры).

Употребляемый в настоящем документе термин «каротиноиды» хорошо известен в

данной области техники. Он включает углеводороды с длинной полиеновой цепью из изопреновых звеньев, содержащей 40 атомов углерода, которая в природе образуется в результате объединения двух молекул геранилгеранилфосфата, содержащих по 20 атомов углерода. К каротиноидам относятся, не ограничиваясь перечисленным здесь, фитоеен, ликопин и каротин, например β -каротин, который, окисляясь по 4-кетогруппе или по 3-гидроксигруппе, дает кантаксантин, зеаксантин или астаксантин. Культивирование и выделение клеток-хозяев, продуцирующих β -каротин и выбираемых из представителей родов *Yarrowia* и *Saccharomyces*, описаны, например, в публикациях WO2008042338 или WO2014096992. Биосинтез каротиноидов в клетках грибов описан, например, в публикации WO2006102342. Получение β -каротина в клетках *Escherichia. coli* описано, например, в патенте США № 20070166782. Получение каротиноидов в клетках *Blakeslea trispora* описано, например, в Европейском патенте № 1367131 или в публикации WO2002010429.

Полученные биотехнологическим путем каротиноиды, в частности β -каротин, как описано в настоящем документе, можно использовать в качестве ингредиентов, например в кристаллическом виде, в пищевых и кормовых продуктах, косметических средствах и фармацевтических препаратах, известных специалистам в данной области техники.

В частности, данное изобретение содержит следующие воплощения:

(1) Способ повышения титра β -каротина, получаемого путем ферментации в клетках *Blakeslea trispora*, продуцирующих β -каротин, включающий добавление эффективного количества куркумина в процессе ферментации.

(2) Способ, как в воплощении (1), в котором указанный куркумин добавляют в количестве 1% или меньше относительно массы ферментационной среды.

(3) Способ, как в воплощении (1) или (2), в котором указанный куркумин добавляют в количестве 0,3% или меньше относительно массы ферментационной среды.

(4) Способ, как в воплощении (1), (2) или (3), в котором указанный куркумин добавляют в количестве 0,1% или меньше относительно массы ферментационной среды.

(5) Способ, как в воплощении (1), (2), (3) или (4), в котором указанный куркумин добавляют в количестве 0,03% или меньше относительно массы ферментационной среды.

(6) Способ, как в воплощении (1), (2), (3), (4) или (5), который также уменьшает количество 7,8-дигидро- β -каротина, образующегося в процессе ферментации.

(7) Способ, как в воплощении (1), (2), (3), (4), (5) или (6), в котором количество 7,8-дигидро- β -каротина, образующегося в процессе ферментации, составляет менее 7% от массы

ферментационной среды.

(8) Способ, как в воплощении (1), (2), (3), (4), (5), (6) или (7), в котором в процессе ферментации не добавляют изониазид.

(9) Способ уменьшения количества 7,8-дигидро-β-каротина, образующегося в процессе ферментации при получении β-каротина в клетках *Blakeslea trispora*, продуцирующих β-каротин, который включает добавление эффективного количества куркумина в процессе ферментации.

(10) Способ, как в воплощении (9), в котором указанный куркумин добавляют в количестве 1,0% или меньше относительно массы ферментационной среды.

(11) Способ, как в воплощении (9) или (10), в котором указанный куркумин добавляют в количестве 0,3% или меньше относительно массы ферментационной среды.

Нижеследующие примеры являются лишь иллюстративными и никак не ограничивают объем данного изобретения. Содержание всех цитируемых в данной патентной заявке литературных источников, в том числе патентных заявок, патентов и публикаций патентных заявок, включается в настоящий документ путем отсылки, в частности публикаций WO2008042338, WO2014096992, WO2006102342 и WO2002010429, патента США № 20070166782, Европейского патента № 1367131.

Примеры

Пример 1. Методы, штаммы и плазмиды

Среда для посева клеток в встряхиваемые колбы MIBLT-1. Смешивали кукурузную муку (23,5 г/л), соевый шрот (23 г/л), глюкозу (10 г/л), KH_2PO_4 (0,5 г/л); доводили pH до 6,3; гомогенизировали с помощью блендера Ultra-Turrax® blender (Ika) в течение 8 мин при скорости вращения 13 500 об/мин; нагревали при 70°C в течение 45 мин, после чего автоклавировали.

Среда для продуцирования в встряхиваемых колбах MF-BLT-22. Смешивали кукурузную муку (17,5 г/л), соевую муку (40 г/л), соевый лецитин (10 г/л), KH_2PO_4 (0,5 г/л), соевое масло (109 г/л), при необходимости изониазид (0,28 г/л), при необходимости куркумин (1,0; 0,3; 0,1; 0,03 или 0,01% масса/объем); доводили pH до 6,3; гомогенизировали с помощью блендера Ultra-Turrax® blender (Ika) в течение 8 мин при скорости вращения 13 500 об/мин; нагревали при 70°C в течение 45 мин, после чего автоклавировали.

Раствор А. Смесь дихлорметана и метилового спирта в соотношении 1:1.

Культивирование в встряхиваемых колбах. В конические плоскодонные колбы

(Эрленмейера) объемом 250 или 300 мл, содержащие по 30 мл среды для посева (MIBLT-1), вносили споры штамма *B. trispora* (-) до концентрации $4,5 \times 10^3$ спор/мл. В другие колбы Эрленмейера, содержащие по 30 мл среды MIBLT-1, вносили споры штамма *B. trispora* (+) до концентрации $1,5 \times 10^3$ спор/мл. Колбы инкубировали в темноте при температуре 27°C в течение 48 ч при скорости перемешивания 220 об/мин, с амплитудой перемещения 5 см. Отбирали 3 мл культуры штамма (+) и вносили в 30 мл культуры штамма (-) и инкубировали смесь этих совместимых штаммов в темноте при температуре 27°C в течение 48 ч при скорости перемешивания 220 об/мин, с амплитудой перемещения 5 см. В колбы Эрленмейера объемом 250 или 300 мл, содержащие по 20 мл среды для продуцирования MF-BLT-22 вносили по 2 мл смеси совместимых штаммов. Инкубировали в темноте при температуре 25°C (скорость перемешивания 250 об/мин, амплитуда перемещения 5 см). Через 48 часов после внесения смеси спор в каждую колбу добавляли 40 мкл стерильного 50%-ного (объем/объем) раствора β -ионона в абсолютном этиловом спирте. Культуры возвращали в инкубатор и держали там, считая с момента внесения спор, 7 суток.

Приготовление образца для высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC). Из каждой колбы культуру переносили в коническую колбу объемом 50 мл и гомогенизировали при помощи блендера Ultra-Turrax® (Ika) в течение 2 мин при скорости вращения 24 000 об/мин. Отвешивали 1 г полученного гомогената в мерную колбу на 100 мл. Прибавляли в эту колбу 80 мл раствора А и подвергали воздействию ультразвука в течение 5 мин. Доводили объем до 100 мл раствором А и перемешивали в течение 60 мин, после чего оставляли еще на 1 ч.

Анализ HPLC. Из полученного, как описано выше, экстракта отбирали 10 мкл и вносили в откалиброванную систему HPLC с колонкой Suplex-PKB-100 (Supelco); скорость потока 0,6 мл/мин, температура колонки 30°C. Подвижная фаза содержала (в расчете на 1 л) 455 мл ацетонитрила, 500 мл метилового спирта, 0,2 мл N-этилдиизопропиламина, 25 мл 0,2%-ного водного раствора ацетата аммония и 50 мг бутилгидрокситолуола (БНТ), растворенного в 20 мл изопропилового спирта. Идентификацию и количественное определение соединений проводили в ультрафиолетовом диапазоне на длине волны 448 нм.

Пример 2. Получение β -каротина в клетках *B. trispora* в присутствии куркумина

Концентрацию β -каротина определяли, как описано в Примере 1, сравнивая эффект разных концентраций куркумина. По данным, представленным в таблице 1, видно, что

наибольший прирост количества β -каротина наблюдался при концентрации куркумина в среде для продуцирования каротиноидов 0,3% (масса/объем). При добавлении изониазида в концентрации 0,28 г/л получалось 4,17 г/л β -каротина, то есть прирост по сравнению с отсутствием добавок был меньше, чем при добавлении куркумина в концентрации 0,3% или 1,0%.

Таблица 1. Влияние куркумина на образование β -каротина. Прирост β -каротина – это увеличение его процентного содержания в присутствии куркумина по сравнению с контролем – отсутствием добавок (куркумина или изониазида) при продуцировании каротиноидов. Приведенные значения – средние по двум измерениям. Подробнее см. в тексте.

Куркумин [масса/объем]	Изониазид [г/л]	β -Каротин [г/л]	Прирост β -каротина
Нет	Нет	1,55	-
Нет	0,28	4,17	-
0,01%	Нет	1,74	12%
0,03%	Нет	2,45	58%
0,1%	Нет	3,48	125%
0,3%	Нет	4,99	222%
1,0%	Нет	4,55	194%

Пример 3. Влияние присутствия куркумина при продуцировании каротиноидов клетками *B. trispora* на профиль чистоты получаемого β -каротина

Ферментацию и анализ продуктов осуществляли, как описано в Примере 2, включая добавление куркумина в разных концентрациях. Количество образующихся β -каротина и 7,8-дигидро- β -каротина определяли методом HPLC (см. Пример 1); полученные результаты представлены в таблице 2. Наибольший эффект наблюдался в присутствии куркумина в концентрации от 0,3% до 1,0% (масса/объем): прирост процентного содержания β -каротина относительно суммарного количества каротиноидов составлял 10,3-11,2%, а снижение процентного содержания 7,8-дигидро- β -каротина относительно суммарного количества каротиноидов составляло 65,4-67,7%. При добавлении изониазида содержание 7,8-дигидро- β -каротина в смеси образующихся каротиноидов было 28,1%, а прирост количества β -каротина – менее 10% относительно суммарного количества каротиноидов.

Таблица 2. Влияние куркумина на количество образующихся β -каротина и 7,8-дигидро- β -каротина (в процентах относительно суммарного количества каротиноидов). «Нет» в левом столбце – контроль (отсутствие куркумина в процессе продуцировании каротиноидов). Приведенные значения – средние по двум измерениям. Подробнее см. в тексте.

Куркумин [масса/объем]	β -Каротин [%]	7,8-дигидро- β -каротин [%]
Нет	82,87	9,67
0,01%	81,19	9,98
0,03%	85,59	6,99
0,1%	86,75	5,79
0,3%	91,44	3,35
1,0%	92,17	3,12

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ ферментативного получения каротиноидов, в клетках-хозяевах, продуцирующих каротиноиды, предпочтительно являющихся природными продуцентами каротиноидов, более предпочтительно в клетках *Blakeslea trispora*, предполагающий проведение ферментации в присутствии эффективного количества куркумина, который добавляют в процессе ферментации, предпочтительно в концентрации менее около 1,0% (масса/объем).

2. Способ по пункту 1, в котором концентрация куркумина, добавляемого в процессе ферментации, составляет от около 0,01% до около 1,0% (масса/объем), предпочтительно от около 0,3% до около 1,0% (масса/объем).

3. Способ по пункту 1 или 2, в котором количество продуцируемого β -каротина увеличивается по меньшей мере на около 12% по сравнению с ферментацией без добавления куркумина.

4. Способ по любому из пунктов 1-4, в котором снижено образование 7,8-дигидро- β -каротина при ферментации.

5. Способ по пункту 4, в котором процентное содержание 7,8-дигидро- β -каротина относительно суммарного количества каротиноидов, образующихся в процессе ферментации, снижено до около 7% или меньше, предпочтительно до около 3%.

6. Способ по любому из пунктов 4-5, в котором процентное содержание 7,8-дигидро- β -каротина, образующегося в процессе ферментации, на 70% меньше, чем при ферментации без добавления куркумина.

7. Способ по любому из пунктов 1-6, в котором процентное содержание β -каротина относительно суммарного количества каротиноидов, образующихся в процессе ферментации, увеличено предпочтительно на около 3-11%.

8. Способ по пункту 7, в котором процентное содержание β -каротина относительно суммарного количества каротиноидов, образующихся в процессе ферментации, составляет 90% или больше по сравнению с ферментацией без добавления куркумина.

9. Способ по любому из пунктов 1-8, в котором ферментация осуществляется без добавления изониазида в процессе ферментации.

10. Применение куркумина, добавляемого в эффективном количестве в процессе ферментации в клетках-хозяевах, продуцирующих каротиноиды, предпочтительно являющихся природными продуцентами каротиноидов, более предпочтительно в клетках

Blakeslea trispora, для повышения процентного содержания β -каротина относительно суммарного количества каротиноидов предпочтительно по меньшей мере на около 3%.

11. Применение куркумина, добавляемого в эффективном количестве - предпочтительно в концентрации 1,0% (масса/объем) или меньше - в процессе ферментации в клетках-хозяевах, продуцирующих каротиноиды, предпочтительно являющихся природными продуцентами каротиноидов, более предпочтительно в клетках *Blakeslea trispora*, для снижения процентного содержания 7,8-дигидро- β -каротина относительно суммарного количества каротиноидов, предпочтительно на около 70%.

12. Применение куркумина по пункту 10 или 11, в котором куркумин добавляется в процессе ферментации в концентрации от около 0,1% до около 1,0% (масса/объем).