



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: **2009133995/10, 10.09.2009**

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
10.09.2009

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: **10.09.2009**

(43) Дата публикации заявки: **20.03.2011** Бюл. № 8

(45) Опубликовано: **27.12.2011** Бюл. № 36

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **SU 763464 A1, 15.09.1980. КОЧЕТОВ Г.А. Практическое руководство по энзимологии. - М., 1971, Высшая. школа, с.127-134. SU 174588 A1, 25.10.1965. См. Интернет <http://medi.ru/pbmc/8810301.htm>, 2001.**

Адрес для переписки:

**650056, г.Кемерово, б-р Строителей, 47,
Кемеровский технологический институт
пищевой промышленности, А.Ю. Просекову**

(72) Автор(ы):

**Крупин Алексей Владимирович (RU),
Бабич Ольга Олеговна (RU),
Сухих Станислав Алексеевич (RU),
Просеков Александр Юрьевич (RU),
Короткая Елена Валерьевна (RU)**

(73) Патентообладатель(и):

**ООО "Инновационно-исследовательский
центр" (RU)**

(54) СПОСОБ ПРОИЗВОДСТВА МУЛЬТИФЕРМЕНТНОГО ПРЕПАРАТА

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии, в частности к получению мультферментных препаратов, и может быть использовано на предприятиях пищевой промышленности в качестве получения препаратов, направленных на снижение токсического действия алкоголя и продуктов его метаболизма. Способ предусматривает культивирование дрожжей в биореакторе на мелассной среде с добавлением молочной сыворотки в количестве 50% от общего объема питательной среды. Клетки дрожжей отделяют от культуральной жидкости центрифугированием и подвергают трансформации на шаровой мельнице при температуре $25 \pm 2^\circ\text{C}$ при скорости вращения ротора 10000 об/мин в течение $2,0 \pm 0,3$ ч. Трансформированные клетки дрожжей экстрагируют 0,06 мМ фосфатным буфером pH 8,5 при температуре $37 \pm 2^\circ\text{C}$ с последующим

центрифугированием с получением супернатанта. Полученный супернатант подвергают двукратной обработке охлажденным раствором ацетона с получением осадка. Полученный осадок растворяют в дистиллированной воде и подвергают диализу против дистиллированной воды в течение 3 ч при температурем $+4 \pm 2^\circ\text{C}$ и центрифугируют с получением супернатанта. Полученный супернатант подвергают микрофилтрации на мембранах с размерами пор 0,22 мкм и удаляют балластные белки с помощью ионообменной хроматографии на колонке с КМ- и ДЭАЭ-целлюлозой. Изобретение позволяет получить этанол-окисляющий мультферментный препарат с высокой степенью чистоты и высокой каталитической активностью и повысить выход биомассы дрожжей.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 437 935** (13) **C2**

(51) Int. Cl.

C12N 9/60 (2006.01)

C12N 9/04 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: **2009133995/10, 10.09.2009**

(24) Effective date for property rights:
10.09.2009

Priority:

(22) Date of filing: **10.09.2009**

(43) Application published: **20.03.2011 Bull. 8**

(45) Date of publication: **27.12.2011 Bull. 36**

Mail address:

**650056, g.Kemerovo, b-r Stroitelej, 47,
Kemerovskij tekhnologicheskij institut pishchevoj
promyshlennosti, A.Ju. Prosekovu**

(72) Inventor(s):

**Krupin Aleksej Vladimirovich (RU),
Babich Ol'ga Olegovna (RU),
Sukhikh Stanislav Alekseevich (RU),
Prosekov Aleksandr Jur'evich (RU),
Korotkaja Elena Valer'evna (RU)**

(73) Proprietor(s):

OOO "Innovatsionno-issledovatel'skij tsentr" (RU)

(54) METHOD OF PRODUCING MULTI-ENZYME PREPARATION

(57) Abstract:

FIELD: chemistry.

SUBSTANCE: method involves culturing yeast in a bioreactor on a molasses medium with addition of milk whey in amount of 50% of the total volume of the culture medium. Yeast cells are separated from the culture fluid by centrifuging and subjected to transformation on a ball mill at temperature $25 \pm 2^\circ\text{C}$ at rotor speed 10000 rpm for 2.0 ± 0.3 hours. The transformed yeast cells are extracted with 0.06 mM phosphate buffer with pH 8.5 and temperature $37 \pm 2^\circ\text{C}$, followed by centrifuging to obtain supernatant fluid. The obtained supernatant fluid is treated twice with cooled acetone solution to obtain

a precipitate. The obtained precipitate is dissolved in distilled water and subjected to dialysis against distilled water for 3 hours at temperature $+4 \pm 2^\circ\text{C}$ and centrifuged to obtain supernatant fluid. The obtained supernatant undergoes microfiltration on membranes with pore size 0.22 mcm and ballast proteins are removed via ion-exchange chromatography on a column with CM and DEAE cellulose.

EFFECT: invention enables to obtain an ethanol-oxidising multi-enzyme preparation with high degree of purity and high catalytic activity and increase output of yeast biomass.

3 ex

Изобретение относится к области получения мультиферментных препаратов, в частности получению этанол-окисляющего мультиферментного препарата, и может быть использовано на предприятиях биотехнологической промышленности в качестве получения препаратов, направленных на снижение токсического действия алкоголя и продуктов его метаболизма.

Известен способ получения ферментного препарата алкогольдегидрогеназы, культивирование дрожжей при аэрации в периодическом режиме на синтетической питательной среде, содержащие источники азота, фосфора, минеральные соли и 2% метилового спирта в качестве источника углерода, а также выделение фермента (Metra, R.J. Pyridine Nucleotide-Linked Oxidation of methanol in methanol-assimilating yeasts. - Bacteriology. - 1975. - V.3. - P.1165-1167). Однако данный способ не позволяет получить из дрожжей ферментный препарат, специфичный к алкоголю и ацетальдегиду высокой каталитической активности. Кроме того, он не может быть использован в пищевой промышленности, в связи с тем, что не отвечает требованиям по микробиологической чистоте ГосФармакопеи.

Известен также другой способ получения ферментного препарата из дрожжей, предусматривающий культивирование дрожжей в проточных условиях, где в качестве источника углерода используют этиловый спирт, после чего дрожжи подвергают растиранию на стеклянных бусах и центрифугированию с последующей очисткой хроматографическим методом на ДЕАЭ-целлюлозе (авторское свидетельство SU 763464, 15.09.1980). Это техническое решение является наиболее близким к заявленному по совокупности существенных признаков (прототип). Недостатками является то, что данный способ позволяет выделить из дрожжей один фермент с низкой каталитической активностью к субстрату, кроме того, полученный препарат загрязнен микрофлорой и балластными белками.

Технической задачей изобретения является выделение алкогольдегидрогеназы и альдегиддегидрогеназы с высокой каталитической активностью в одном препарате, повышение их каталитической активности, предназначенной для применения в биотехнологической промышленности.

Технический результат достигается за счет культивирования дрожжей рода *Saccharomyces cerevisiae* в биореакторе на питательной среде, состоящей из мелассы и молочной сыворотки (соотношение 1:1) при температуре процесса $30 \pm 2^\circ\text{C}$, продолжительностью 18 ч, при скорости аэрации воздуха $30 \pm 0,2$ л/ч и скорости перемешивания 500 ± 5 об/мин. При меньшем содержании молочной сыворотки наблюдается увеличения выхода биомассы дрожжей и снижается каталитическая активность ферментного комплекса состоящего из АДГ и АЛДГ. При массовой доле молочной сыворотки в питательной среде более 50% не наблюдается увеличение выхода биомассы дрожжей и целевого продукта. По окончании процесса культивирования дрожжи отделяют от культуральной жидкости центрифугированием в течение 15 ± 1 мин при 15000 ± 100 об/мин и промывают дистиллированной водой. При этом каталитическая активность ферментного комплекса составляет для АДГ $20 \pm 1,2$ Е/мг белка, а для АЛДГ $0,3 \pm 0,02$ Е/мг белка, что значительно выше, чем при культивировании дрожжей на питательной среде, не содержащей сыворотку.

Для более полного извлечения дрожжевые клетки подвергают трансформации на планетарной шаровой мельнице РМ400, в которой разрушение клеток происходит за счет быстрой вибрации, создаваемой стеклянными шарами марки Glass beads approximately 80 mesh. Процесс трансформации ведут при скорости вращения ротора 10000 об/мин в течение $2,0 \pm 0,03$ ч.

Для выделения ферментного комплекса, состоящего из АДГ и АЛДГ, проводят экстракцию разрушенных клеток дрожжей 0,06 мМ фосфатным буфером pH 8,5 при температуре $37\pm 2^\circ\text{C}$ в течение 2 ч, с последующим центрифугированием при 5000 об/мин в течение 15 мин. Далее супернатант двукратно обрабатывают охлажденным до минус $2\pm 1^\circ\text{C}$ раствором ацетона с массовой долей 95%, выдерживают для образования осадка 30 мин и центрифугируют при температуре минус $2\pm 1^\circ\text{C}$ при скорости ротора 15000 об/мин в течение 30 мин. Осадок растворяют в дистиллированной воде и раствор подвергают диализу в течение 3 часов против дистиллированной воды при температуре плюс $4\pm 2^\circ\text{C}$. По окончании диализа раствор центрифугируют при скорости ротора 15000 об/мин в течение 40 мин и проводят ультрафильтрацию супернатантана при температуре $25\pm 2^\circ\text{C}$, давлении 0,1-0,3 МПа в течение 3 ч. Концентрат направляют на микрофильтрацию на мембранах с диаметром пор 0,22 мкм при температуре плюс $19\pm 2^\circ\text{C}$, давлении 0,3-0,4 МПа, что позволило получить концентрат, соответствующий по микробиологическим показателям требованиям Государственной Фармакопеи.

Очистку фракции от положительно заряженных белков проводят с использованием метода ионообменной хроматографии (ИОХ) на колонке с карбоксиметилцеллюлозой (КМ-целлюлоза). Для этого элюцию осуществляют ступенчато в фосфатном буфере (pH 6,5) со скоростью $10\text{ см}^3/\text{ч}$. При этом степень очистки фермента на этой стадии составила 10,5, выход по активности и белку 25,4 и 4,3% соответственно.

Последующую очистку проводят на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой. Для этого ферментный комплекс, состоящий из АДГ и АЛДГ, наносят на предварительно уравновешенную фосфатным буфером pH 7,5 колонку с ДЭАЭ-целлюлозой. Элюцию сорбированных белков осуществляют раствором 4,5М NaCl в ступенчатом градиенте концентраций 0-15 моль/л. Степень очистки ферментного комплекса, состоящего из АДГ и АЛДГ, составляет 90,3%.

С целью устранения действия пептидаз на полученный высокоочищенный ферментный комплекс, состоящий из АДГ и АЛДГ и создания оптимальных условий его работы в живом организме (pH 8-9,5, присутствие коферментов НАД и НАДН) подвергают полимеризации с помощью водного раствора агарозы с массовой долей 9%. С этой целью ферментный комплекс, содержащий АДГ и АЛДГ, коферменты НАД и НАДН добавляют в 9% водный раствор агарозы и оставляют при температуре $2\pm 2^\circ\text{C}$ на 1 час, после застывания продукта его подвергают гомогенизации.

В результате приведенной технологии из дрожжей выделяют ферментный комплекс, состоящий из АДГ и АЛДГ, и получают этанол-метаболизирующий препарат с высокой каталитической активностью АДГ 1290 Е/мг белка и АЛДГ 39,0 Е/мг белка.

Пример 1. Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* культивируют на питательной среде, содержащей 50% мелассы и 50% молочной сыворотки в периодическом ферментере с рабочим объемом 5,0 л. Для предотвращения спенивания в среду добавляют силиконовое масло в количестве 0,01%. Аэрацию воздуха ведут со скоростью $30\pm 0,2$ л/ч, скорость перемешивания питательной среды и биомассы составляет 500 ± 5 об/мин. Процесс культивирования ведут при температуре $30\pm 2^\circ\text{C}$ в течение 18 ч.

По окончании процесса культивирования дрожжи отделяют от культуральной жидкости центрифугированием в течение 20 ± 1 мин при 12000 ± 100 об/мин и промывают дистиллированной водой. При этом каталитическая активность ферментного комплекса составляет для АДГ $20\pm 1,2$ Е/мг белка, а для АЛДГ $0,2\pm 0,01$

Е/мг белка, что значительно выше, чем при культивировании дрожжей на питательной среде, не содержащей молочную сыворотку.

Для более полного извлечения ферментного комплекса, состоящего из АДГ и АЛДГ, дрожжевые клетки подвергают трансформации на планетарной шаровой мельнице РМ400, в которой разрушение клеток происходит за счет быстрой вибрации, создаваемой стеклянными шарами марки Glass beads approximately 80 mesh. Процесс трансформации ведут при скорости вращения ротора 10000 об/мин в течение $2,0 \pm 0,03$ ч.

Для выделения ферментного комплекса, состоящего из АДГ и АЛДГ, проводят экстракцию разрушенных клеток дрожжей 0,06 М фосфатным буфером pH 8,5 при температуре $37 \pm 2^\circ\text{C}$ в течение 2 ч, с последующим центрифугированием при 5000 об/мин в течение 15 мин. Далее супернатант двукратно обрабатывают охлажденным до минус $2 \pm 1^\circ\text{C}$ раствором ацетона с массовой долей 95%, выдерживают для образования осадка 30 мин и центрифугируют при температуре минус $2 \pm 1^\circ\text{C}$ при скорости ротора 15000 об/мин в течение 30 мин. Осадок растворяют в дистиллированной воде и раствор подвергают диализу в течение 3 часов против дистиллированной воды при температуре плюс $4 \pm 2^\circ\text{C}$. По окончании диализа раствор центрифугируют при скорости ротора 15000 об/мин в течение 30 мин и проводят ультрафильтрацию супернатанта при температуре 25°C , давлении 0,1-0,3 МПа в течение 3 ч. Концентрат направляют на микрофильтрацию на мембранах с диаметром пор 0,22 мкм при температуре плюс $19 \pm 2^\circ\text{C}$, давлении 0,3-0,4 МПа, что позволило получить концентрат, соответствующий по микробиологическим показателям требованиям Государственной Фармакопеи.

Очистку ферментной фракции от положительно заряженных белков проводят с использованием метода ионообменной хроматографии (ИОХ) на колонке с карбоксиметилцеллюлозой (КМ-целлюлоза). Для этого элюцию осуществляют ступенчато в фосфатном буфере (pH 6,5) со скоростью $15 \text{ см}^3/\text{ч}$. При этом степень очистки фермента на этой стадии составила 10,5, выход по активности и белку 18,2 и 3,2% соответственно.

Последующую очистку проводят на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой. Для этого этанол-окисляющую систему наносят на предварительно уравновешенную фосфатным буфером pH 7,5 колонку с ДЭАЭ-целлюлозой.

Элюцию сорбированных белков осуществляют раствором 4,5М NaCl в ступенчатом градиенте концентраций 0-15 моль/л. Степень очистки ферментного комплекса, состоящего из АДГ и АЛДГ, составляет 90,5%.

С целью устранения действия пептидаз на полученный высокоочищенный ферментный комплекс, состоящий из АДГ и АЛДГ, и создания оптимальных условий его работы в живом организме (pH 8-9,5, присутствие коферментов НАД и НАДН) подвергают комплекс полимеризации с помощью водного раствора агарозы с массовой долей 9%. Полимеризацию ведут при температуре плюс $2 \pm 2^\circ\text{C}$ в течение 1 ч, после чего продукт подвергают гомогенизации.

В результате приведенной технологии из дрожжей выделяют ферментный комплекс, состоящий из АДГ и АЛДГ, и получают этанол-метаболизирующий препарат с высокой каталитической активностью АДГ 1290 Е/мг белка и АЛДГ 39,0 Е/мг белка.

Пример 2. Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* культивируют согласно примеру 1. По окончании процесса культивирования дрожжи отделяют от культуральной жидкости центрифугированием в течение 30 ± 1 мин при 10000 ± 100 об/мин и промывают дистиллированной водой. При этом каталитическая активность ферментного комплекса, состоящего из АДГ и АЛДГ, составляет для АДГ $16 \pm 1,2$ Е/мг белка, а для

АЛДГ $0,15 \pm 0,01$ Е/мг белка, что значительно выше, чем при культивировании дрожжей на питательной среде, не содержащей молочную сыворотку.

Для более полного извлечения ферментного комплекса, состоящего из АДГ и АЛДГ, дрожжевые клетки подвергают трансформации на планетарной шаровой мельнице РМ400, в которой разрушение клеток происходит за счет быстрой вибрации, создаваемой стеклянными шарами марки Glass beads approximately 100 mesh. Процесс трансформации ведут при скорости вращения ротора 10000 об/мин в течение $2,0 \pm 0,03$ ч.

Для выделения ферментного комплекса, состоящего из АДГ и АЛДГ, проводят экстракцию разрушенных клеток дрожжей 0,06 М фосфатным буфером pH 8,5 при температуре $37 \pm 2^\circ\text{C}$ в течение 2 ч, с последующим центрифугированием при 5000 об/мин в течение 15 мин. Далее супернатант двукратно обрабатывают охлажденным до минус $2 \pm 1^\circ\text{C}$ раствором ацетона с массовой долей 95%, выдерживают для образования осадка 30 мин и центрифугируют при температуре минус $2 \pm 1^\circ\text{C}$ при скорости ротора 15000 об/мин в течение 30 мин. Осадок растворяют в дистиллированной воде и раствор подвергают диализу в течение 3 часов против дистиллированной воды при температуре плюс $4 \pm 2^\circ\text{C}$. По окончании диализа раствор центрифугируют при скорости ротора 12000 об/мин в течение 60 мин и проводят ультрафильтрацию супернатанта при температуре $26 \pm 2^\circ\text{C}$, давлении 0,1-0,3 МПа в течение 3 ч. Концентрат направляют на микрофильтрацию на мембранах с диаметром пор 0,40 мкм при температуре плюс $19 \pm 2^\circ\text{C}$ давлении 0,3-0,4 МПа, что позволило получить концентрат соответствующий по микробиологическим показателям требованиям Государственной Фармакопеи.

Очистку ферментной фракции от положительно заряженных белков проводят с использованием метода ионообменной хроматографии (ИОХ) на колонке с карбоксиметилцеллюлозой (КМ-целлюлоза). Для этого элюцию осуществляют ступенчато в фосфатном буфере (pH 6,5) со скоростью 10 см³/ч. При этом степень очистки фермента на этой стадии составила 10,5, выход по активности и белку 20,7 и 3,8% соответственно.

Последующую очистку проводят на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой. Для этого ферментный комплекс, состоящий из АДГ и АЛДГ, наносят на предварительно уравновешенную фосфатным буфером pH 7,5 колонку с ДЭАЭ-целлюлозой. Элюцию сорбированных белков осуществляют раствором 4,5М NaCl в ступенчатом градиенте концентраций 0-15 моль/л. Степень очистки этанол-окисляющей системы составляет 83,5%.

С целью устранения действия пептидаз на полученный высокоочищенный ферментный комплекс, состоящий из АДГ и АЛДГ, и создания оптимальных условий его работы в живом организме (pH 8-9,5, присутствие коферментов НАД и НАДН) подвергают комплекс полимеризации с помощью водного раствора агарозы с массовой долей 9%. Полимеризацию ведут при температуре плюс $2 \pm 2^\circ\text{C}$ в течение 1 ч, после чего продукт подвергают гомогенизации.

В результате приведенной технологии из дрожжей выделяют ферментный комплекс, состоящий из АДГ и АЛДГ, и получают этанол-метаболизирующий препарат с высокой каталитической активностью АДГ 780,0 Е/мг белка и АЛДГ 28,0 Е/мг белка.

Пример 3. Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* культивируют согласно примеру 1. При этом каталитическая активность ферментного комплекса для АДГ $18,0 \pm 1,2$ Е/мг белка, а для АЛДГ $0,2 \pm 0,01$ Е/мг белка, что значительно выше, чем при культивировании дрожжей на питательной среде, не содержащей молочную сыворотку.

Дрожжевые клетки подвергают трансформации на планетарной шаровой мельнице РМ400, в которой разрушение клеток происходит за счет быстрой вибрации, создаваемой стеклянными шарами марки Glass beads approximately 60 mesh. Процесс трансформации ведут при скорости вращения ротора 10000 об/мин в течение 2,0±0,03 ч.

Для выделения ферментного комплекса, состоящего из АДГ и АЛДГ, проводят экстракцию разрушенных клеток дрожжей 0,06 мМ фосфатным буфером рН 8,5 при температуре 37±2°С в течение 2 ч, с последующим центрифугированием при 5000 об/мин в течение 15 мин. Далее супернатант двукратно обрабатывают охлажденным до минус 2±1°С раствором ацетона с массовой долей 95%, выдерживают для образования осадка 30 мин и центрифугируют при температуре минус 2±1°С при скорости ротора 15000 об/мин в течение 30 мин. Осадок растворяют в дистиллированной воде и раствор подвергают диализу в течение 3 часов против дистиллированной воды при температуре плюс 4±2°С. По окончании диализа раствор центрифугируют при скорости ротора 12000 об/мин в течение 60 мин и проводят ультрафильтрацию супернатанта при температуре 24±2°С, давлении 0,1-0,3 МПа в течение 3 ч. Концентрат направляют на микрофильтрацию на мембранах с диаметром пор 0,22 мкм при температуре плюс 19±2°С, давлении 0,3-0,4 МПа, что позволило получить концентрат, соответствующий по микробиологическим показателям требованиям Государственной Фармакопеи.

Очистку ферментной фракции от положительно заряженных белков проводят с использованием метода ионообменной хроматографии (ИОХ) на колонке с карбоксиметилцеллюлозой (КМ-целлюлоза). Для этого элюцию осуществляют ступенчато в фосфатном буфере (рН 6,5) со скоростью 15 см³/ч. При этом степень очистки фермента на этой стадии составила 10,5, выход по активности и белку 18,2 и 3,2% соответственно.

Последующую очистку проводят на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой. Для этого этанол-окисляющую систему наносят на предварительно уравновешенную фосфатным буфером рН 7,5 колонку с ДЭАЭ-целлюлозой. Элюцию сорбированных белков осуществляют раствором 4,5М NaCl в ступенчатом градиенте концентраций 0-15 моль/л. Степень очистки ферментного комплекса, состоящего из АДГ и АЛДГ, составляет 83,5%.

С целью устранения действия пептидаз на полученный высокоочищенный ферментный комплекс, состоящий из АДГ и АЛДГ, и создания оптимальных условий его работы в живом организме (рН 8-9,5, присутствие коферментов НАД и НАДН) подвергают комплекс полимеризации с помощью водного раствора агарозы с массовой долей 9%. Полимеризацию ведут при температуре плюс 2±2°С в течение 1 ч, после чего продукт подвергают гомогенизации.

В результате приведенной технологии из дрожжей выделяют ферментный комплекс, состоящий из АДГ и АЛДГ, и получают этанол-метаболизирующий препарат с высокой каталитической активностью АДГ 830,0 Е/мг белка и АЛДГ 25,0 Е/мг белка.

Предлагаемый способ позволяет получить этанол-окисляющий мультиферментный препарат с высокой степенью чистоты и высокой каталитической активностью по алкогольдегидрогеназе (в 4,0 раза выше чем в прототипе) и альдегиддегидрогеназе. Также разработанная технология позволяет повысить выход биомассы дрожжей и использовать этанол-окисляющий мультиферментный препарат в пищевой промышленности.

Формула изобретения

Способ производства мультиферментного препарата, предусматривающий культивирование дрожжей в биореакторе на мелассной среде с добавлением молочной сыворотки в количестве 50% от общего объема питательной среды, отделение клеток дрожжей центрифугированием, трансформацию дрожжей на шаровой мельнице при температуре $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ при скорости вращения ротора 10000 об/мин в течение $2,0\pm 0,03$ ч, экстракцию разрушенных клеток дрожжей 0,06 мМ фосфатным буфером pH 8,5 при температуре $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ с последующим центрифугированием с получением супернатанта, двукратную обработку полученного супернатанта охлажденным раствором ацетона с получением осадка, растворение осадка в дистиллированной воде, диализ против дистиллированной воды в течение 3 ч при температуре плюс $4\pm 2^{\circ}\text{C}$, центрифугирование с получением супернатанта с последующей микрофилтрацией на мембранах с размерами пор 0,22 мкм и удалением балластных белков с помощью ионообменной хроматографии на колонке с КМ- и ДЭАЭ-целлюлозой.