

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **037230**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.02.24

(21) Номер заявки
201692263

(22) Дата подачи заявки
2015.05.08

(51) Int. Cl. **C12P 39/00** (2006.01)
C12R 1/645 (2006.01)
C12R 1/01 (2006.01)

(54) ДРОЖЖЕВАЯ КЛЕТКА ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ПРОИЗВОДСТВЕ ВИТАМИНА B12 С ПОМОЩЬЮ СОВМЕСТНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ С ПРОПИОНОБАКТЕРИЯМИ

(31) **14167774.0**

(32) **2014.05.09**

(33) **EP**

(43) **2017.04.28**

(86) **PCT/EP2015/060270**

(87) **WO 2015/169967 2015.11.12**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
АЦИЕС БИО Д.О.О.; АРИМА Д.О.О.
(SI)

(72) Изобретатель:
Швагель Мирьян, Фуйс Штефан,
Косец Грегор, Петковиц Хрвойе (SI)

(74) Представитель:
Веселицкая И.А., Кузенкова Н.В.,
Веселицкий М.Б., Белоусов Ю.В.,
Каксис Р.А., Куликов А.В., Кузнецова
Е.В., Соколов Р.А., Кузнецова Т.В.
(RU)

(56) DANILOVA I.V. ET AL.: "A positive effect of Propionibacterium freudenreichii on the growth of Saccharomyces cerevisiae during their cocultivation", APPLIED BIOCHEMISTRY AND MICROBIOLOGY, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS-PLENUM PUBLISHERS, NE, vol. 42, no. 4, 1 July 2006 (2006-07-01), pages 378-383, XP019389679, ISSN: 1608-3024, DOI: 10.1134/S0003683806040065, the whole document
WO-A1-2008030089

I. ATHANASIADIS ET AL.: "Whey Liquid Waste of the Dairy Industry as Raw Material for Potable Alcohol Production by Kefir Granules", JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY, vol. 50, no. 25, 1 December 2002 (2002-12-01), pages 7231-7234, XP055113829, ISSN: 0021-8561, DOI: 10.1021/jf020331q, the whole document
WO-A1-2011140649

(57) В изобретении описана грибная клетка, такая как клетка дрожжей, обладающая способностью расти при совместном культивировании с Propionibacterium. Кроме того, описаны способы получения указанных клеток и ферментационные процессы, в которых применяют грибную клетку, предлагаемую в изобретении, и Propionibacterium для совместного культивирования. Указанное совместное культивирование существенно снижает нагрузку по химической потребности в кислороде отходов ферментационного бульона.

B1**037230****037230****B1**

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к области технологии биопроцессов, прежде всего биопроцессов, в которых используют совместные культуры дрожжей и пропионовокислых бактерий (пропионобактерий) (т.е. *Propionibacterium* sp.).

Предпосылки создания изобретения

Совокупность отходов всех видов с высокой химической потребностью в кислороде (ХПК) для окисления органических веществ представляет собой экологическую нагрузку, которая требует соответствующего подхода. Указанные совокупности отходов могут представлять собой побочные продукты различных отраслей промышленности, таких как молочная промышленность, промышленность, связанная с переработкой фруктов и овощей или получением сахара. Примером является (молочная) сыворотка, которая образуется в качестве побочного продукта в молочной промышленности при производстве сыров. Этот процесс приводит к образованию в больших объемах сыворотки (сладкой или кислой), которая имеет высокую величину ХПК, но которая с другой стороны, не поддается простой/экономичной утилизации иным путем из-за относительно низкого содержания важного для этой цели сухого содержимого, т.е. молочного белка и лактозы.

В зависимости от процесса получения сыров величина ХПК остатков сыворотки может составлять от 35000 мг O_2 /л до 100000 мг O_2 /л. Основной вклад в высокую органическую нагрузку вносит лактоза, на долю которой может приходиться вплоть до 90% от величины ХПК. В случае кислой сыворотки присутствие молочной кислоты даже усугубляет указанную проблему. На долю лактозы приходится также примерно 75% сухого продукта сыворотки и ее саму можно использовать в процессах утилизации с помощью микроорганизмов. Изучено несколько путей утилизации сыворотки, такие как получение биоэтанола и биогаза, экстракция лактозы или белков, производство органических кислот или биомассы, однако потребность в экономичном пути утилизации сыворотки все еще сохраняется.

В WO 2011/140649 описана утилизация сыворотки с помощью смешанной культуры молочнокислых бактерий и дрожжей с получением съедобной биомассы. Процесс позволяет успешно снижать величину ХПК сыворотки, но конечный продукт имеет низкую коммерческую ценность.

Сыворотку можно применять для культивирования бактерий рода *Propionibacterium* sp., принадлежащего к отряду актиномицетов (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1-е изд. 1986)). *Propionibacterium* sp. являются известными продуцентами ценных продуктов, таких как органические кислоты (пропионовая и уксусная кислота), витамин B12 и бифидогенные вещества. Хотя *Propionibacterium* sp. можно успешно культивировать на сыворотке, они не позволяют существенно снизить нагрузку по ХПК, поскольку они продуцируют органические кислоты, которые накапливаются в ферментированной (истощенной) сыворотке и вносят значимый вклад в конечную нагрузку по ХПК. Ниже в контексте настоящего описания понятия "*Propionibacterium* sp." и "пропионобактерия" применяют взаимозаменяемо.

Известно, что совместное культивирование *Propionibacterium* sp. и других бактерий может снижать нагрузку по ХПК истощенной среды (Miyano и др., 2000), но указанные процессы имеют недостатки, связанные с тем, что они не пригодны для продуктов пищевого качества и поэтому их нельзя применять в процессе переработки растений в пищу.

Известно, что метаболиты, продуцируемые *Propionibacterium* sp., ингибируют рост других микроорганизмов, прежде всего грибов, и их применение для предупреждения порчи пищевых продуктов хорошо известно. В US 5260061 описано применение метаболитов *Propionibacterium* sp. в пищевых продуктах для ингибирования роста дрожжей. В WO 2008/030089 описано совместное культивирование *Propionibacterium* sp. и дрожжей для получения хороших вкусоароматических характеристик в процессе приготовления сыра. В этом случае *Propionibacterium* sp. применяли для контроля и окончательного ингибирования роста дрожжей в смешанной культуре, поскольку применяемые дрожжевые клетки не обладали толерантностью к ингибирующим рост субстанциям из *Propionibacterium* sp.

С учетом описанного выше существующего уровня техники объектом изобретения является разработка новых биопроцессов для получения ценных биотехнологических продуктов из сладкой или кислой сыворотки, в которых конечные ферментационные среды характеризуются относительно низкой величиной ХПК. Другим объектом изобретения является создание грибных клеток, которые можно применять в процессах, предлагаемые в изобретении.

Краткое изложение сущности изобретения

В настоящем изобретении вышеуказанные задачи решаются с помощью создания новых грибных клеток, предпочтительно дрожжевых клеток, которые могут расти при совместном культивировании с пропионобактериями. Указанные грибные клетки или клетки могут характеризоваться/отличаться их способностью расти в супернатанте (истощенная среда) стационарной фазы, который образовался при культивировании пропионобактерий. Настоящее изобретение относится также к биотехнологическим процессам, в которых используют указанные грибные клетки, которые могут расти в присутствии указанной среды при совместном культивировании с пропионобактериями.

Таким образом, первым объектом настоящего изобретения являются грибные клетки, обладающие способностью расти в супернатанте стационарной фазы, который образовался при культивировании пропионобактерий.

Указанную грибную клетку можно воспроизводимо получать с помощью процедур мутагенеза/селекции, которые описаны в настоящей заявке на патент. Грибные клетки, в частности дрожжевые клетки, которые обладают способностью расти в супернатанте стационарной фазы, который образовался при культивировании пропионобактерий, являются ценными с позиций снижения нагрузки по ХПК отходов после процессов ферментации, указанных в изобретении. Указанные грибные клетки (в частности, дрожжевые клетки) к настоящему времени не доступны специалистам в данной области.

Грибные клетки, предлагаемые в изобретении, можно легко идентифицировать и отличать от других грибных клеток с помощью процедур, представленных ниже в настоящем описании. В частности, описаны четко определенная среда для культивирования и четко определенные условия культивирования пропионобактерий для тестирования способности грибных клеток "расти в супернатанте стационарной фазы, который образовался при культивировании пропионобактерий", предлагаемых в изобретении.

Таким образом, в предпочтительном варианте осуществления изобретения супернатант стационарной фазы (который можно применять для решения вопроса о том, является ли грибная клетка клеткой, предлагаемой в изобретении, или нет), получают из стационарной культуры *Propionibacterium freudenreichii*, культивированной в анаэробных условиях при 35°C и pH 6,5 в среде, содержащей 60 г/л порошкообразной сладкой сыворотки, 5 г/л дрожжевого экстракта и 40 мг/л D-пантотената кальция. Предпочтительно порошкообразная сладкая сыворотка имеет качество, пригодное для пищевых продуктов, и предпочтительно она содержит по меньшей мере 63 мас.% лактозы, по меньшей мере 10 мас.% белка и максимум 5 мас.% воды.

Способность расти на супернатанте стационарной фазы, полученном при культивировании пропионобактерий, культивируемой грибной (дрожжевой) культуры, можно определять в понятиях максимальной скорости роста, достигаемой грибной клеткой, при выращивании в супернатанте стационарной фазы, полученном при культивировании пропионобактерий. Таким образом, в другом предпочтительном варианте осуществления изобретения указанную способность указанной грибной клетки расти в супернатанте стационарной фазы, полученном при культивировании пропионобактерий, определяют как способность указанной грибной клетки расти в указанном супернатанте стационарной фазы с максимальной скоростью роста ($\mu_{\max}$), составляющей по меньшей мере 0,02 ч⁻¹. Методы определения скорости роста микроорганизма в культуре хорошо известны в данной области.

О стационарном состоянии культуры при культивировании пропионобактерий может свидетельствовать постоянная концентрация уксусной кислоты и пропионовой кислоты в культуральной среде в течение промежутка времени, когда культуру не подвергают аэрации. В другом варианте осуществления изобретения о стационарном состоянии культуры пропионобактерий свидетельствует постоянная плотность клеток пропионобактерий (в г массы в сухом состоянии (DW)/л) в течение времени.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения способность грибной клетки расти в супернатанте стационарной фазы, полученном при культивировании пропионобактерий, оценивали с помощью метода анализа, описанного ниже в примере 2.

Предпочтительная грибная клетка представляет собой дрожжевую клетку.

В одном из вариантов осуществления изобретения дрожжевая клетка представляет собой дрожжевую клетку, депонированную 14 января 2014 г. в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ) под регистрационным номером DSM 28271.

Вторым объектом изобретения является процесс получения биотехнологического продукта, где процесс заключается в том, что совместно культивируют пропионобактерию и грибную клетку в среде для культивирования. Грибная клетка предпочтительно обладает способностью расти в супернатанте стационарной фазы, полученном при культивировании пропионобактерий.

Грибная клетка предпочтительно представляет собой дрожжевую клетку, такую как грибная клетка, предлагаемая в изобретении, которая описана выше и ниже.

Биотехнологический продукт предпочтительно представляет собой продукт, продуцируемый пропионобактерией.

Предпочтительный биотехнологический продукт представляет собой витамин B12.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения процесс включает первую фазу, на которой отсутствует аэрация, за которой следует вторая фаза, на которой аэрация имеет место. Предпочтительно обе фазы осуществляют в течение по меньшей мере 24, или 48, или 72 ч.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения по меньшей мере 90% роста пропионобактерии [в % от массы (в г) в сухом состоянии] происходит во время указанной первой фазы без аэрации.

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения по меньшей мере 90% роста грибной клетки [в % от массы (в г) в сухом состоянии] происходит во время указанной второй фазы, на которой имеет место аэрация.

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения химическая потребность в кислороде (ХПК) среды для культивирования снижается до уровня, равного или более низкого чем 25%, предпочтительно равного или более низкого чем 10%, или равного или более низкого чем 1%, от начальной величины ХПК среды для культивирования.

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения среда для культивирования представляет собой сыворотку (или содержит ее). Среда для культивирования представляет собой или содержит, например, сладкую сыворотку или кислую сыворотку.

Предпочтительно в процессах, предлагаемых в изобретении, указанную грибную клетку добавляют в культуру в момент времени, когда плотность пропионовобактерии достигает примерно 90% от ее максимальной клеточной плотности [г (DW)/л], или после указанного момента времени. В других вариантах осуществления изобретения грибную клетку добавляют, когда пропионовобактерия достигает своей стационарной фазы роста, или после этого.

Изобретение относится также к способу получения толерантного к пропионовобактериям штамма грибов, такого как толерантный к пропионовобактериям штамм дрожжей. Способ заключается в том, что:

- 1) получают исходный штамм гриба;
- 2) подвергают исходный штамм гриба воздействию мутагена и/или мутагенных условий;
- 3) культивируют указанный на стадии 2 подвергнутый указанному воздействию штамм гриба в присутствии первых концентраций уксусной кислоты и/или (предпочтительно "и") пропионовой кислоты;
- 4) необязательно подвергают указанный на стадии 3 культивируемый штамм гриба воздействию мутагена и/или мутагенных условий и культивируют указанный необязательно подвергнутый указанному воздействию штамм гриба в присутствии вторых концентраций уксусной кислоты и/или (предпочтительно "и") пропионовой кислоты, где указанные вторые концентрации предпочтительно выше, чем указанные первые концентрации соответственно;
- 5) подвергают указанный на стадии 3 или 4 культивируемый штамм гриба воздействию мутагена и/или мутагенных условий;
- 6) культивируют указанный на стадии 5 подвергнутый указанному воздействию культивируемый штамм гриба в среде, которая содержит супернатант стационарной фазы, полученный при культивировании пропионовобактерий;
- 7) необязательно повторяют стадию 6 с возрастающими концентрациями супернатанта стационарной фазы, полученного при культивировании пропионовобактерий;
- 8) получают тем самым грибную клетку, обладающую способностью расти в супернатанте стационарной фазы, полученном при культивировании пропионовобактерий.

Предпочтительным мутагеном согласно изобретению является этилметансульфонат. Однако можно применять любой другой мутаген, т.е. химический или физический агент, который повышает частоту встречаемости мутаций. Известные мутагены, которые можно применять в указанном выше способе, включают реактивные виды кислорода (ROS), такие как супероксид, гидроксильные радикалы и пероксид водорода; деаминирующие агенты, например азотистую кислоту; полициклический ароматический углеводород (ПАН); алкилирующие агенты, такие как этилнитрозомочевина или метилметансульфонат; гуанин; нитрозамины; нитрозгуанидин; горчичный газ; винилхлорид; ароматические амины; амиды; 2-ацетиламинофлуорен; алкалоиды из растений, например алкалоиды из видов барвинка (*Vinca*); бром; соединения, который содержат бром в своей химической структуре; азид натрия; бензол.

Приемлемыми мутагенными условиями или физическими мутагенами являются, например, УФ-излучение, обработка рентгеновскими лучами и/или воздействие радиоактивности.

Специалисту в данной области должно быть очевидно, что указанные выше стадии 2-4 можно исключать, например, если исходный штамм на стадии 1 уже является в достаточной степени толерантным к уксусной кислоте и/или пропионовой кислоте или в результате иных причин обладает способностью к росту в среде, содержащей супернатант стационарной фазы, полученный при культивировании пропионовобактерий. В этом случае исходный штамм на стадии 1 непосредственно подвергают воздействию мутагена и/или условий, указанных для стадии 5.

Следующим объектом настоящего изобретения является штамм гриба, полученный с помощью описанного выше способа.

Краткое описание чертежей

На чертежах показано

на фиг. 1 - утилизация лактозы *Propionibacterium* sp. и производство уксусной и пропионовой кислоты и витамина B12 в двухстадийном процессе на сыворотке. В этом случае величину ХПК можно снижать с 85000 мг O₂/л до 36000 мг O₂/л. Ферментацию осуществляли в течение периода времени вплоть до 75 ч без аэрации и после 75 ч начинали аэрацию;

на фиг. 2 - утилизация лактозы *Propionibacterium* sp. и производство уксусной и пропионовой кислоты и витамина B12 в двухстадийном процессе на сыворотке, в которую добавляли толерантную культуру дрожжей DSM 28271 на стадии, на которой интродуцировали кислород. В этом случае величину ХПК можно снижать с 85000 мг O₂/л до 13000 мг O₂/л. Ферментацию осуществляли в течение периода времени вплоть до 75 ч без аэрации и после 75 ч интродуцировали дрожжи и начинали аэрацию;

на фиг. 3 - схема биопроцесса для совместного культивирования *Propionibacterium* sp. с толерантными дрожжами, предлагаемыми в изобретении;

на фиг. 4 - утилизация лактозы *Propionibacterium* sp. и производство уксусной и пропионовой кислоты и витамина B12 в двухстадийном процессе на сыворотке, в которую добавляли толерантную куль-

туру дрожжей *K.lactis* ABLMKL6 на стадии, на которой интродуцировали кислород. В этом случае величину ХПК можно снижать с 80000 мг O_2 /л до 14500 мг O_2 /л. Ферментацию осуществляли в течение периода времени вплоть до 112 ч без аэрации и после 112 ч интродуцировали дрожжи и начинали аэрацию.

Подробное описание изобретения

Понятие "супернатант" или "культуральный супернатант" в контексте настоящего изобретения означает жидкость, полученную после фильтрации или центрифугирования ферментационного бульона, в результате чего удаляются клетки и другой нерастворимый продукт. Супернатант содержит любые питательные вещества и другие компоненты культуральной среды, не поглощенные (пока) микроорганизмом, или продукты расщепления, и любые продукты, продуцируемые микроорганизмом в процессе ферментации.

Под "культуральной средой" следует понимать содержащую питательные вещества среду, в которой микроорганизм может расти. Предпочтительными являются жидкие культуральные среды.

Под "бульоном" или "ферментационным бульоном" следует понимать культуральную среду, в которой растет или рос микроорганизм. Бульон может содержать неиспользованные питательные вещества и/или продукты, продуцируемые микроорганизмом.

Под "супернатантом стационарной фазы" или "истощенной средой" в контексте настоящего изобретения следует понимать супернатант, полученный из ферментационного бульона, присутствующего на стационарной фазе.

Под стационарной фазой следует понимать фазу культивирования, на которой микроорганизм имеет практически приостановленный рост, например, когда микроорганизм достиг максимальной клеточной плотности в процессе культивирования. Стационарную фазу культивирования можно определять также посредством мониторинга концентрации продуктов ферментации. В одном из вариантов осуществления изобретения стационарную фазу при культивировании пропионобактерии определяют как фазу, которая начинается с момента времени, в который концентрация уксусной кислоты и/или пропионовой кислоты достигла максимального значения или в альтернативном варианте достигла 90% от максимального значения.

"Сыворотка" представляет собой побочный продукт молочной промышленности, который отделяется от молока после свертывания, когда добавляют сычуг или кислую субстанцию, или они образуются *in situ*. "Сладкая сыворотка" образуется в процессе приготовления твердых сычужных сыров типа чеддера или швейцарского сыра. "Кислотная сыворотка" или "кислая сыворотка" представляет собой побочный продукт, образовавшийся в процессе изготовления молочных продуктов кислых типов, таких как домашний сыр или греческий (процеженный) йогурт.

Под "химической потребностью в кислороде" или "ХПК" следует понимать химическую потребность в кислороде, которую определяют по стандартному методу по ISO 6060:1989. Подразумевается, что образец можно разбавлять водой, если подлежащая измерению величина ХПК превышает определенную согласно этому методу максимальную допустимую величину ХПК, составляющую 700 мг/л. Затем ХПК рассчитывают, определяя величину ХПК путем умножения на фактор разведения.

В настоящем изобретении предложены грибные клетки, толерантные к совместному культивированию с пропионобактерией. В настоящем изобретении предложен также процесс совместного культивирования пропионобактерии и грибной клетки, где клетка обладает толерантностью к ингибирующим соединениям, продуцируемым пропионобактерией.

В изобретении предложены грибные клетки, которые обладают способностью расти в присутствии пропионобактерии и их обладающих ингибирующим действием метаболитов. Указанные клетки получают с помощью процедур селекции встречающихся в естественных условиях случайных мутантов из общедоступных грибных клеток на ростовых субстратах, в которых предварительно культивировали пропионобактерии. Предпочтительно селекцию указанных толерантных грибных клеток осуществляют с использованием по меньшей мере двух стадий. На первой стадии отбирают случайных мутантов грибных клеток, которые могут переносить более высокие концентрации органических кислот, например уксусной кислоты и пропионовой кислоты. На второй стадии случайных мутантов указанных толерантных к кислотам клеток подвергают дополнительному циклу селекции на применяемой ростовой среде, в которой ранее культивировали пропионобактерии, и они достигали стационарной фазы роста. Предпочтительно предлагаемые в изобретении грибные клетки представляют собой клетки дрожжей.

Грибные клетки, предлагаемые в настоящем изобретении, которые толерантны к совместному культивированию с пропионобактериями, например, обладают способностью расти на супернатанте стационарной фазы культуры пропионобактерий, можно получать с помощью классических методов селекции, возможно, дополнительно применяя неспецифический мутагенез, с помощью генетической инженерии или с помощью скрининга встречающихся в естественных условиях изолятов.

Биотехнологический процесс, предлагаемый в изобретении, с использованием толерантных дрожжевых клеток в процессе совместного культивирования с пропионобактерией, может включать следующие стадии:

- 1) приготовление культуральной среды;
- 2) инокуляция пропионобактерией;

- 3) ферментация без аэрации;
- 4) переключение на аэробные условия;
- 5) инокуляция толерантными дрожжевыми клетками;
- 6) продолжение ферментации в режиме совместного культивирования пропионовобактерий и дрожжей;
- 7) необязательно последующая обработка и выделение продукта.

Ферментационная среда.

Ферментационная среда может представлять собой любую приемлемую ферментационную среду, в которой могут расти и пропионовобактерий, и грибные клетки. Например, ферментационная среда может содержать мелассу или сыворотку. Ферментационная среда может состоять из совокупности всех видов отходов различных отраслей промышленности (таких как сыворотка), к которой можно добавлять специфические добавки (такие как минералы, витамины, азот и дополнительные источники углерода, предшественники и т.д.) для повышения скорости роста или образования требуемых продуктов. Среда может содержать различные источники углерода, такие как глюкоза, лактоза, фруктоза, молочная кислота, и источники азота, такие как сульфат аммония, аминокислоты, пептиды и белки, которые являются пригодными для пропионовобактерий. Значение pH ферментационной среды можно регулировать в начале процесса или можно поддерживать во время процесса ферментации для обеспечения хорошего роста пропионовобактерий и/или образования продукта.

Среду в норме обрабатывают с помощью процесса инактивации значительной доли микроорганизмов, которые могут в начале присутствовать в ферментационной среде, перед инокуляцией пропионовобактерий. Указанные процессы могут представлять собой стерилизацию/ пастеризацию, например автоклавирование, фильтрацию, облучение и/или химические обработки.

Сосуд для ферментации или ферментер должен быть подготовлен с помощью метода, который позволяет удалять значительную долю первоначально присутствующих микроорганизмов, после чего его заполняют ферментационной средой. Сосуд для культивирования, который можно применять в процессах, предлагаемых в изобретении, может быть очень простым, если он позволяет поддерживать требуемую температуру и позволяет осуществлять соответствующее перемешивание для предупреждения высоких градиентов значений pH или питательных веществ. В идеальном варианте в нем можно поддерживать небольшое избыточное давление.

Инокуляция пропионовобактериями.

Инокуляция с использованием пропионовобактерий может состоять из одной или нескольких стадий в зависимости от конечного объема затравочной культуры и применяемого процесса. Инокулят можно приготавливать в среде, которая поддерживает рост пропионовобактерий. Инокулят культивируют при предпочтительной температуре в течение требуемого времени, после чего его можно применять для инокуляции ферментационной среды. Объемы инокулятов для последующих стадий инокуляции или стадии ферментации могут находиться в диапазоне от 1 до 20%.

Ферментация без аэрации.

Ферментационный бульон сначала поддерживают без аэрации при температуре, требуемой для оптимального роста или образования продукта. Температура может находиться в диапазоне от 25 до 40°C, предпочтительно составлять 35°C. Если в ферментационной среде присутствуют сахара, то значение pH требуется поддерживать на требуемом уровне, который может составлять от 5,5 до 8,0, предпочтительно 6,5. Значение pH можно поддерживать с помощью нескольких различных кислот/оснований, таких как H_2SO_4 , HCl , $NaOH$, NH_4OH и т.д. Биопроцесс можно осуществлять без аэрации или его можно поддерживать, осуществляя барботирование CO_2 и/или N_2 и/или прилагая избыточное давление. Предпочтительным является культивирование при избыточном давлении CO_2 .

Перемешивание ферментационной среды должно быть достаточным для предупреждения больших градиентов pH и его можно осуществлять (но, не ограничиваясь только указанными устройствами) с помощью турбин Руштона, морских винтов или наружного и/или внутреннего рециркулирующего насоса.

Переключение на аэробные условия.

После истощения питательных веществ, потребляемых пропионовобактериями, культуры можно переключать на аэробные условия. Воздух можно интродуцировать в сосуд для культивирования и его должно быть достаточно для роста описанных ниже дрожжей. Скорость аэрации влияет также на скорость, с которой дрожжи метаболизируют органические кислоты, продуцируемые пропионовобактериями.

В это время можно интродуцировать дополнительные добавки, которые либо влияют на свойства бульона (т.е. противовспенивающие агенты), либо влияют на образование продуктов, продуцируемых пропионовобактериями (т.е. 5,6-диметилбензмидазол), либо влияют на рост дрожжей или образование продукта (источники азота, предшественники и т.д.).

После переключения культуры на аэробные условия значение pH вновь надо поддерживать на требуемом уровне. Для обеспечения роста дрожжей значение pH может составлять от 5,5 до 8, предпочтительно 6,5.

Инокуляция толерантных к пропионовобактериям дрожжевых клеток.

Инокуляция с использованием толерантных дрожжевых клеток может состоять из одной или не-

скольких стадий в зависимости от конечного объема затравочной культуры. Инокулят дрожжей приготавливают в среде, поддерживающей рост дрожжей. Инокулят культивируют при предпочтительной температуре в течение требуемого времени. Затем инокулят дрожжей можно применять для инокуляции ферментационной среды с культивируемыми пропионабактериями, после чего условия культивирования переключают на аэробные. Объемы инокулятов для последующих стадий инокуляции или конечной стадии могут находиться в диапазоне от 1 до 20%. Предпочтительно на долю инокулята дрожжей приходится 5% от конечного объема.

Продолжение ферментации с использованием полученной совместной культуры микроорганизмов.

Ферментационный бульон поддерживают при требуемой температуре и постоянно поддерживают значение pH на требуемом уровне путем добавления соответствующей кислоты или основания. Перемешивание и аэрацию требуется поддерживать на требуемых уровнях для гарантии полной утилизации органических кислот. Степень аэрации и/или перемешивания влияет на метаболизм органических кислот дрожжами.

В это время можно интродуцировать дополнительные добавки, которые либо влияют на свойства бульона (т.е. противовспенивающие агенты), либо влияют на образование продуктов, продуцируемых пропионабактериями (т.е. 5,6-диметилбензмидазол), либо влияют на рост дрожжей или образование продукта. Осуществляют мониторинг величины ХПК супернатанта ферментационного бульона и выход ценных продуктов, продуцируемых либо пропионабактериями, либо дрожжевыми клетками, для обеспечения требуемых свойств бульона. При применении указанной процедуры совместного культивирования величину ХПК супернатанта бульона можно снижать менее чем 20000 мг O₂/л, предпочтительно менее чем 15000 мг O₂/л, более предпочтительно менее чем 10000 мг O₂/л и еще более предпочтительно менее чем 5000 мг O₂/л. Если выбранный обладающий большой ценностью продукт представляет собой витамин B12, выход витамина B12 может составлять более чем 5 мг/л, предпочтительно более чем 10 мг/л, более предпочтительно более чем 20 мг/л и еще более предпочтительно более чем 100 мг/л.

Последующая обработка ферментационного бульона.

После поглощения органических кислот и после того, как величина ХПК супернатанта достигает удовлетворительного уровня, биопроцесс останавливают. Смешенную биомассу пропионабактерий/дрожжей в сочетании с нерастворимыми компонентами бульона можно отделять от супернатанта путем центрифугирования, фильтрации или любого другого приемлемого метода. Супернатант имеет низкую величину ХПК и создает небольшую нагрузку (на окружающую среду), если его вносить в воду для обработки растения, или в идеальном случае величина ХПК является столь низкой, что его можно вносить непосредственно в окружающую среду. Если биомасса обогащена ценными субстанциями, такими как витамины и белки, прежде всего витамин B₁₂, то эти субстанции можно применять в качестве добавки к корму для животных. Альтернативно этому, биомассу можно использовать в качестве исходного продукта для выделения ценных субстанций, таких как витамин B₁₂, в любой форме (например, цианокобаламин или метилкобаламин). В зависимости от степени чистоты витамин B₁₂ можно применять в качестве добавки к корму для животных или в качестве фармацевтической или пищевой добавки для потребления человеком.

Согласно изобретению дрожжи могут относиться к роду *Kluyveromyces* (например, *K.lactis*; *K.marxianus*), предпочтительно *K.lactis*, и/или к роду *Yarrowia*, предпочтительно *Y.lipolytica*. Однако штамм может принадлежать также к роду *Debaryomyces* (например, *Debaryomyces hansenii*), *Candida* (например, *Candida versatilis*), *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Pichia*, *Trichosporon* (например, *Trichosporon beigellii*), *Torulaspora*, *Issatchenkia* (например, *Issatchenkia orientalis*), *Geotrichum*, *Saccharomyces* или *Zygosaccharomyces*. Указанные клетки известны в данной области и являются доступными и их можно либо получать из депозитов институтов, либо их можно выделять из пищевых продуктов.

Примеры

Пример 1. Получение толерантных к пропионабактериям дрожжевых клеток.

Дрожжи *Candida utilis* NRRL Y-7586 культивировали в среде YEPD, содержащей дрожжевой экстракт (20 г/л), пептон (20 г/л) и декстрозу (10 г/л), при 35°C в течение 72 ч, промывали дважды 0,1М фосфатным буфером (pH 7) и обрабатывали мутагеном (этилметансульфонат) в соответствующей дозе для получения уровня уничтожения 99,9%. Можно использовать любую другую приемлемую грибную клетку или дрожжевую клетку. Выжившие клетки культивировали в среде, содержащей дрожжевой экстракт (10 г/л) и уксусную и пропионовую кислоты в минимальной ингибирующей концентрации. После культивирования в течение 3 дней при 35°C аликвоту из этого бульона переносили в среду YEPD, давали расти в течение 72 ч и подвергали другому циклу мутагенеза. Затем выжившие клетки культивировали в среде, содержащей дрожжевой экстракт (10 г/л) и уксусную и пропионовую кислоты в более высокой концентрации (относительно предыдущего цикла). Указанную процедуру многократно повторяли вплоть до появления у дрожжей способности переносить высокие концентрации уксусной и пропионовой кислот (т.е. дрожжи могли расти и потреблять уксусную и пропионовую кислоты в концентрациях 15 г/л). Таким путем получали штамм *C.utilis* ABLMCU1.

Для полученного штамма *C.utilis* (ABLMCU1), который обладал толерантностью к высоким кон-

центрациям уксусной и пропионовой кислот, применяли аналогичную схему мутагенеза/селекции, используя в этом случае разведенный супернатант стационарной фазы, полученный при ферментации пропионовых бактерий, в качестве ингибирующего агента. Более подробно: клетки *C. utilis*, которые в результате предыдущей селекции обладали толерантностью к органическим кислотам, выращивали в среде YEPD, обрабатывали этилметансульфонатом и затем культивировали в среде, которая представляла собой смесь супернатанта стационарной фазы, полученного при ферментации штамма *Propionibacterium freudenreichii* ABLM1700 в сыворотке (сыворотка, 5 г/л дрожжевого экстракта, 20 мг/л CoCl_2 , *Propionibacterium freudenreichii*, культивированные в течение 96 ч при 35°C, супернатант, обозначенный ниже как среда "As"), и среду применяли для создания дрожжевых клеток, толерантных к органическим кислотам (т.е. уксусная кислота (15 г/л), пропионовая кислота (15 г/л) и дрожжевой экстракт (10 г/л) (обозначена в контексте настоящего описания как среда "Bs"). Указанные смеси смешивали в соотношении As:Bs = 3:7, что было выше уровня, при котором дрожжевые клетки штамма ABLMCU1 обладали способностью расти. Через 72 ч аликвоту полученной культуры *C. utilis* переносили в среду YEPD, выращивали и вновь обрабатывали этилметансульфонатом и затем переносили в смесь сред As и Bs с более высоким соотношением As:Bs, таким как 4:6. Указанную процедуру повторяли до получения колоний дрожжей, толерантных к неразбавленному супернатанту стационарной фазы, полученному в результате ферментации пропионовых бактерий (100% As). Полученный штамм дрожжей депонировали 14 января 2014 г. в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ) и ему присвоен регистрационный номер DSM 28271.

Описанная выше процедура приводила к получению толерантного к пропионовым бактериям штамма *C. utilis*. Однако следует отметить, что указанную процедуру успешно применяли также для получения других толерантных к пропионовым бактериям штаммов, т.е. с применением в качестве исходных других штаммов дрожжей. Например, штамм *Kluyveromyces lactis* Y-11591 подвергали сходной процедуре и получали толерантные к пропионовым бактериям штаммы грибов (*K. lactis* ABLMKL6), предлагаемые в изобретении. Таким образом, продемонстрировано, что процедура является воспроизводимой и ее можно применять к другим штаммам дрожжей.

Пример 2. Тест, демонстрирующий "способность расти в супернатанте стационарной фазы, образовавшемся при культивировании пропионовых бактерий".

Следующий метод можно применять для решения вопроса о том, может ли штамм грибов, например штамм дрожжей, "обладать способностью расти в супернатанте стационарной фазы, образовавшемся при культивировании пропионовых бактерий", согласно пункту 1 формулы изобретения.

Стадия 1. Получение супернатанта стационарной фазы, образовавшегося при культивировании пропионовых бактерий.

Применяемую на первой стадии затравочную культуру пропионовых бактерий приготавливали в среде P1 (табл. 1, ниже) следующим образом. 100 мкл маточной культуры пропионовых бактерий, полученной из коллекции культур (*Propionibacterium freudenreichii* ATCC 6207), переносили в 50 мл среды P1 и инкубировали в течение 4 дней при 35°C без аэрации и без встряхивания.

Затем 15 мл применяемой на первой стадии затравочной культуры переносили в 150-миллилитровый стеклянный флакон, заполненный 135 мл среды P2 (табл. 2, ниже) и инкубировали в течение 4 дней при 35°C без аэрации и без встряхивания с получением затравочной культуры для второй стадии.

После этого 100 мл полученной таким образом затравочной культуры для второй стадии применяли для инокуляции корпусного биореактора с перемешиванием, который имел рабочий объем 1 л, заполненного 900 мл среды P3 (табл. 3, ниже). Применяли следующие параметры культивирования: температура: $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$, pH: $6,5 \pm 0,1$ (контроль с помощью 15% NaOH или H_2SO_4), перемешивание: 100 ± 10 об/мин, барботирование CO_2 : $0,1 \pm 0,05$ vvm (отношение количества подводимого воздуха к емкости реактора), концентрация NH_4^+ : 400 ± 100 мг/л (регулирование осуществляли каждые 12 ч с помощью 15% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 6,5). Ферментацию осуществляли до достижения концентрации лактозы, составляющей менее 1 г/л. В конце ферментации сумма концентраций уксусной кислоты и пропионовой кислоты в бульоне предпочтительно превышала или была равна 20 г/л.

50 мл полученного таким образом ферментационного бульона центрифугировали при 10000 g и супернатант переносили в колбу Эрленмейера и автоклавировали при 121°C в течение 20 мин. Автоклавированная среда представляла собой "супернатант стационарной фазы, образовавшийся при культивировании пропионовых бактерий".

Стадия 2. Тестирование способности расти в супернатанте стационарной фазы пропионовых бактерий.

Инокулят грибной клетки, подлежащей тестированию, приготавливали, добавляя 100 мкл маточной культуры в 10 мл среды Y1 (табл. 4). Культуру инокулята инкубировали на роторном шейкере при 35°C и 200 об/мин в течение 72 ч. Образовавшуюся культуру применяли в качестве "грибного инокулята" на следующих стадиях.

Автоклавированную колбу Эрленмейера, которая содержала супернатант стационарной фазы, полученный на описанной выше стадии 1, инокулировали с использованием 2,5 мл грибного инокулята и инкубировали на роторной шейкере при 35°C и 200 об/мин. Начальное значение pH доводили до 6,5. Это рассматривалось как "тестовое культивирование".

Рост гриба оценивали путем измерения изменений в значении pH культуры после культивирования в течение 24 ч. В одном из вариантов осуществления изобретения тестируемую грибную клетку рассматривали как "обладающую способностью расти в супернатанте стационарной фазы пропионовых бактерий" в контексте условий, изложенных в п.1 прилагаемой формулы изобретения, если значение pH бульона при осуществлении тестового культивирования повышалось с исходного pH (pH 6,5) до pH 8,0 или выше после культивирования в течение 24 ч.

Таким образом, тестируемая грибная клетка может рассматриваться как не обладающая способностью расти в супернатанте стационарной фазы, образовавшемся при культивировании пропионовых бактерий, если значение pH бульона при осуществлении тестового культивирования оставалось на уровне ниже 8,0 после культивирования в течение 24 ч.

Заявляемая грибная клетка, которая обладает способностью расти в супернатанте стационарной фазы, образовавшемся при культивировании пропионовых бактерий, предпочтительно представляет собой клетку, рассматриваемую в качестве позитивной по данным описанного выше теста.

Пример 26. Альтернативные тесты.

В альтернативном варианте рост гриба можно оценивать путем измерения изменений ОП культуры после культивирования в течение 24 ч.

Тестируемую грибную клетку можно рассматривать как обладающую способностью расти в супернатанте стационарной фазы, образовавшемся при культивировании пропионовых бактерий, в контексте условий, изложенных в п.1 прилагаемой формулы изобретения, если различие в оптической плотности (измеренной при 620 нм) бульона возрастало по меньшей мере на 0,5 в течение 24 ч после инокуляции. Альтернативно этому, тестируемая грибная клетка рассматривалась как обладающая способностью расти в супернатанте стационарной фазы, образовавшемся в результате культивирования пропионовых бактерий, в контексте условий, изложенных в п.1 прилагаемой формулы изобретения, если максимальная скорость роста ($\mu_{\max}$) грибной клетки при осуществлении тестового культивирования была равна $0,02 \text{ ч}^{-1}$ или выше.

Следовательно, тестируемая грибная клетка рассматривалась как не обладающая способностью расти в супернатанте стационарной фазы, образовавшемся при культивировании пропионовых бактерий, в контексте условий, изложенных в п.1 прилагаемой формулы изобретения, если различие в оптической плотности (измеренной при 620 нм) бульона возрастало менее чем на 0,5 в течение 24 ч после инокуляции. Альтернативно этому, тестируемая грибная клетка рассматривалась как не обладающая способностью расти в супернатанте стационарной фазы, образовавшемся при культивировании пропионовых бактерий, в контексте условий, изложенных в п.1 прилагаемой формулы изобретения, если максимальная скорость роста ($\mu_{\max}$) грибной клетки при осуществлении тестового культивирования составляла менее $0,02 \text{ ч}^{-1}$.

Таким образом, заявляемая грибная клетка, которая обладает способностью расти в супернатанте стационарной фазы, образовавшемся при культивировании пропионовых бактерий, представляет собой клетку, рассматриваемую в качестве позитивной по данным одного из описанных выше тестов.

Таблица 1. Специфическая среда P1 для пропионовых бактерий

Ингредиент	Количество
Триптиказа (фирма BBL)	10 г
Дрожжевой экстракт (фирма Difco)	10 г
DL-лактат натрия (фирма Sigma)	10 г
KH_2PO_4 (фирма Sigma)	2,5 г
MnSO_4 (фирма Sigma)	0,05 г
Дистиллированная вода	до 1000 мл
pH доведено до 7,0 в помощью NaOH/HCl, среда автоклавирована в течение 20 мин при 121°C и 1,2 бара	

Таблица 2. Специфическая среда P2 для пропионовых бактерий

Ингредиент	Количество
Глюкоза (фирма Sigma)	40 г
DL-лактат натрия (фирма Sigma)	40 г
Дрожжевой экстракт (фирма Biolife)	10 г
CaCO_3 (фирма Sigma)	10 г
CoCl_2 (фирма Sigma)	10 мг
D-пантотенат натрия* (фирма Sigma)	20 мг
Дистиллированная вода	до 1000 мл
pH доведено до 7,0 в помощью NaOH/HCl, среда автоклавирована в течение 20 мин при 121°C и 1,2 бара	

*добавляли после стерилизации.

Таблица 3. Среда РЗ для пропионовых бактерий

Ингредиент	Количество
Порошкообразная сладкая сыворотка **	60 г/л
Дрожжевой экстракт (фирма Biolife)	5 г/л
D-пантотенат натрия* (фирма Sigma)	40 мг/л
Автоклавирована в течение 20 мин при 121°C и 1,2 бара	

*добавляли после стерилизации.

** Порошкообразная сладкая сыворотка с чистотой, пригодной для пищевых продуктов, имеющая следующую спецификацию: лактоза - минимум 63 мас.%, белок - минимум 10 мас.%, допустимая влажность - максимум 5%, которую можно получать от различных поставщиков, таких как фирма Hoogwegt International (Нидерланды), фирма Lactalis Ingredients (Франция), фирма James Farrell & Co (США).

Таблица 4. Среда Y1 для дрожжей

Ингредиент	Количество
Бакто-пептон (фирма Biolife)	20 г
Дрожжевой экстракт (фирма Biolife)	10 г
Глюкоза (фирма Sigma)	20 г
Дистиллированная вода	до 1000 мл
Автоклавирована в течение 20 мин при 121°C и 1,2 бар	

Пример 3. Эффективное совместное культивирование пропионовых бактерий и дрожжей.

I) Приготовление инокулята пропионовых бактерий.

Инокулят пропионовых бактерий приготавливали с использованием двух стадий. 0,5 мл маточной суспензии *Propionibacterium freudenreichii* ABLM2475 (можно применять любой другой продуцирующий витамин B12 штамм, такой как *Propionibacterium freudenreichii* ATCC6207) инокулировали в 50 мл первой среды для вегетативного роста (дрожжевой экстракт, 20 г/л и DL-лактат, 20 г/л) и инкубировали в течение 4 дней при 35°C. Затем продукт, полученный на первой вегетативной стадии, переносили в 400 мл среды для второй вегетативной стадии (глюкоза, 40 г/л, дрожжевой экстракт, 40 г/л, DL-лактат, 40 г/л, карбонат кальция, 10 г/л, хлорид кобальта, 20 мг/л, пантотенат, 10 мг/л) и культивировали в течение 4 дней, постоянно нейтрализуя pH с помощью гидроксида натрия. Затем весь продукт, полученный на второй стадии, переносили в биореактор для завершения процесса.

II) Приготовление инокулята толерантных дрожжей.

Инокулят толерантных дрожжей приготавливали также с использованием двух стадий. 0,5 мл маточной суспензии дрожжей штамма DSM 28271 инокулировали 50 мл первой среды для вегетативного роста (дрожжевой экстракт, 40 г/л, пептон, 40 г/л и глюкоза, 10 г/л), содержащейся в 250-миллилитровой колбе Эрленмейера, и инкубировали в течение 2 дней при 35°C на роторной шейкере при 220 об/мин. Затем продукт, полученный на первой вегетативной стадии, переносили в 200 мл такой же среды, содержащейся в 1000-миллилитровой колбе Эрленмейера, и культивировали в течение 2 дней при 35°C на роторной шейкере при 220 об/мин.

III) Ферментация.

Биореактор с рабочим объемом 7 л заполняли 4 л кислой сыворотки (величина ХПК составляла 80000 мг O₂/л), дополненной дрожжевым экстрактом (5 г/л) и хлоридом кобальта (20 мг/л), и стерилизовали в течение 1 ч при 121°C. После охлаждения до 35°C добавляли пантотенат (10 мг/л) и в биореактор вносили затравочную культуру пропионовых бактерий. Температура культивирования составляла 35°C, а скорость перемешивания 100 об/мин. Содержимое биореактора барботировали газообразным CO₂ (10 мл/мин) и значение pH поддерживали на уровне 6,5 (с помощью NaOH). Через 90 ч происходило поглощение лактата и лактозы и образовывалось примерно 8 и 15 г/л уксусной и пропионовой кислот. В этот момент времени добавляли 20 мг/л 5,6-диметилбензимидазола и скорость перемешивания повышали до 500 об/мин и интродуцировали аэрацию при отношении количества подводимого воздуха к емкости реактора (vvm), составляющем 1, и в биореактор вносили 5% толерантных дрожжей. Значение pH поддерживали на уровне 6,5 (с помощью H₂SO₄). Через 48 ч все органические кислоты поглощались дрожжами и ферментацию прекращали. В результате процесса получали 15 мг/л витамина B12. Биомассу, состоящую из пропионовых бактерий и дрожжей, удаляли центрифугированием, и величина ХПК образовавшегося супернатанта составляла 12000 мг O₂/л, т.е. снижалась на 85%.

Схематическая технологическая карта приведенного в качестве примера процесса представлена на фиг. 3.

Пример 4. Эффективное совместное культивирование пропионовых бактерий и дрожжей (*K.lactis* ABLMKL6).

I) Приготовление инокулята пропионовых бактерий.

Инокулят пропионовых бактерий приготавливали с использованием двух стадий. 0,5 мл маточной суспензии *Propionibacterium freudenreichii* ABLM2475 (можно применять любой другой продуцирующий витамин B12 штамм, такой как *Propionibacterium freudenreichii* ATCC6207) инокулировали в 50 мл первой среды для вегетативного роста (дрожжевой экстракт, 20 г/л и DL-лактат, 20 г/л) и инкубировали в

течение 4 дней при 35°C. Затем продукт, полученный на первой вегетативной стадии, переносили в 400 мл среды для второй вегетативной стадии (глюкоза, 40 г/л, дрожжевой экстракт, 40 г/л, DL-лактат, 40 г/л, карбонат кальция, 10 г/л, хлорид кобальта, 20 мг/л, пантотенат, 10 мг/л) и культивировали в течение 4 дней, постоянно нейтрализуя pH с помощью гидроксида натрия. Затем весь продукт, полученный на второй стадии, переносили в биореактор для завершения процесса.

II) Приготовление инокулята толерантных дрожжей.

Инокулят толерантных дрожжей приготавливали также с использованием двух стадий. 0,5 мл маточной суспензии дрожжей *K.lactis* ABLMKL6 инокулировали 50 мл первой среды для вегетативного роста (дрожжевой экстракт, 40 г/л, пептон, 40 г/л и глюкоза, 10 г/л), содержащейся в 250-миллилитровой колбе Эрленмейера, и инкубировали в течение 2 дней при 35°C на роторном шейкере при 220 об/мин. Затем продукт, полученный на первой вегетативной стадии, переносили в 200 мл такой же среды, содержащейся в 1000-миллилитровой колбе Эрленмейера, и инкубировали в течение 2 дней при 35°C на роторном шейкере при 220 об/мин.

III) Ферментация.

Биореактор с рабочим объемом 7 л заполняли 4 л кислой сыворотки (величина ХПК составляла 80000 мг O₂/л), дополненной дрожжевым экстрактом (5 г/л) и хлоридом кобальта (20 мг/л), и стерилизовали в течение 1 ч при 121°C. После охлаждения до 35°C добавляли пантотенат (10 мг/л) и в биореактор вносили затравочную культуру пропионовых бактерий. Температура культивирования составляла 35°C, а скорость перемешивания 100 об/мин. Содержимое биореактора барботировали газообразным CO₂ (10 мл/мин) и значение pH поддерживали на уровне 6,5 (с помощью NaOH). Через 112 ч происходило поглощение лактата и лактозы и образовывалось примерно 4 и 14 г/л уксусной и пропионовой кислот. В этот момент времени добавляли 20 мг/л 5,6-диметилбензимидазола и скорость перемешивания повышали до 500 об/мин и интродуцировали аэрацию при 1 vvm и в биореактор вносили 5% толерантных дрожжей. Значение pH поддерживали на уровне 6,5 (с помощью H₂SO₄). Через 72 ч все органические кислоты поглощались дрожжами и ферментацию прекращали. В результате процесса получали 16 мг/л витамина B12. Биомассу, состоящую из пропионовых бактерий и дрожжей, удаляли центрифугированием и величина ХПК образовавшегося супернатанта составляла 14500 мг O₂/л, т.е. снижалась на 81%.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Дрожжевая клетка для применения в производстве витамина B12 с помощью совместного культивирования с пропионовыми бактериями, где указанная дрожжевая клетка обладает способностью расти в супернатанте стационарной фазы, образовавшемся при культивировании пропионовых бактерий, максимальная скорость роста ($\mu_{\max}$) которой составляет по меньшей мере 0,02 ч⁻¹, и где указанный супернатант стационарной фазы получают из стационарной культуры *Propionibacterium freudenreichii*, культивированной без аэрации при 35°C в жидкой среде, которая содержит порошкообразную сладкую сыворотку в количестве 60 г/л, дрожжевой экстракт в количестве 5 г/л и D-пантотенат кальция в количестве 40 мг/л в воде.

2. Дрожжевая клетка по п.1, где дрожжевая клетка относится к роду *Kluyveromyces*, *Yarrowia*, *Debaryomyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Pichia*, *Trichosporon*, *Torulaspora*, *Issatchenkia* или *Geotrichum*.

3. Клетка *Candida utilis*, депонированная 20 января 2014 г. в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ), Брауншвейг, Германия, и доступная под регистрационным номером DSM 28271, для применения в производстве витамина B12 с помощью совместного культивирования с пропионовыми бактериями.

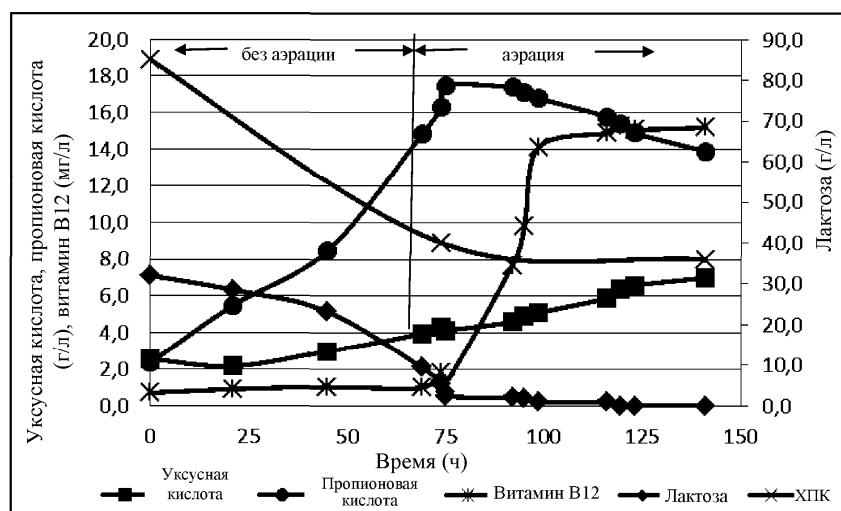
4. Способ получения витамина B12, включающий совместное культивирование пропионовых бактерий и дрожжевой клетки по одному из пп.1-3 в среде для культивирования, содержащей сыворотку; и экстракцию витамина B12, продуцированного указанной пропионовой бактерией из среды для культивирования.

5. Способ по п.4, который включает фазу без аэрации, за которой следует аэробная фаза.

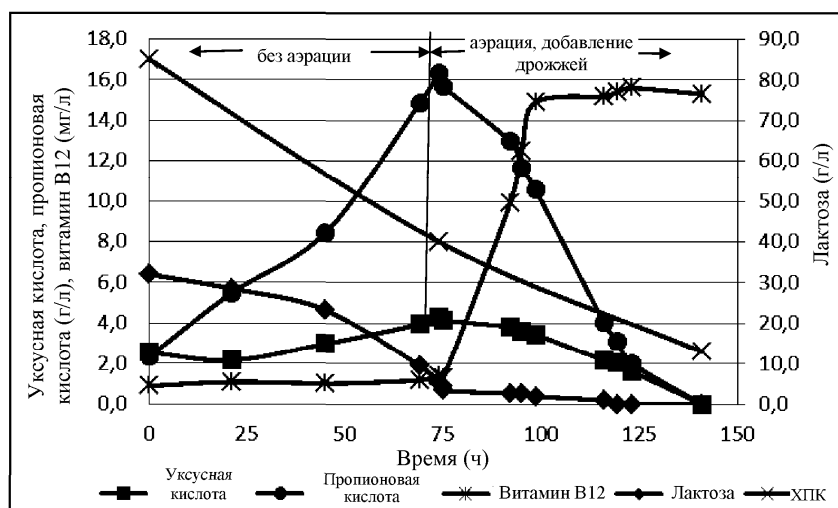
6. Способ по п.5, в котором по меньшей мере 90% роста пропионовых бактерий [в % от массы (г) в сухом состоянии] происходит в течение фазы без аэрации.

7. Способ по п.5 или 6, в котором по меньшей мере 90% роста дрожжевой клетки [в % от массы (г) в сухом состоянии] происходит в течение аэробной фазы.

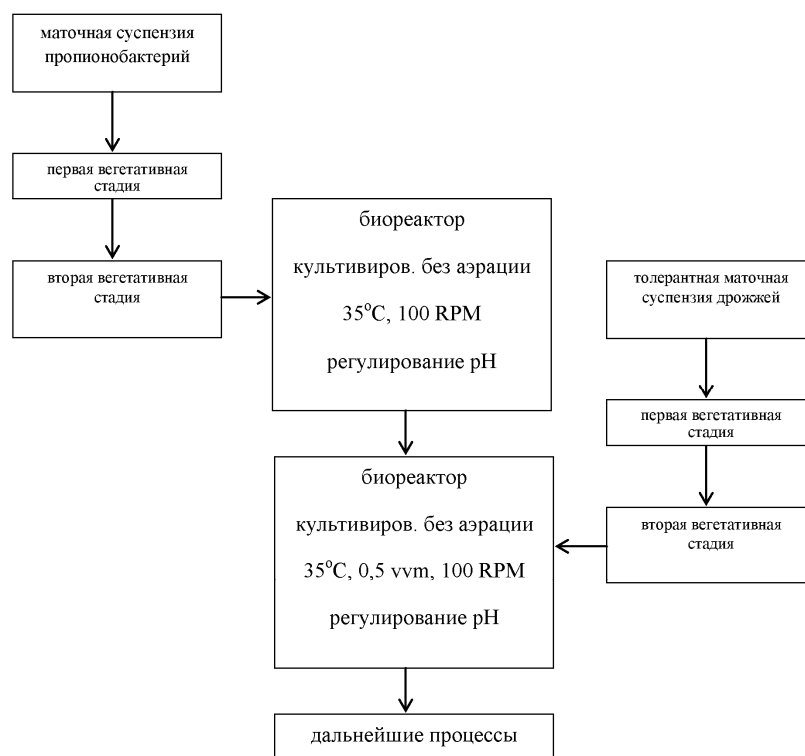
8. Способ по одному из пп.4-7, в котором химическую потребность в кислороде (ХПК) среды для культивирования снижают до уровня, равного или более низкого, чем 25%, предпочтительно равного или более низкого, чем 10%, от начальной величины ХПК среды для культивирования.



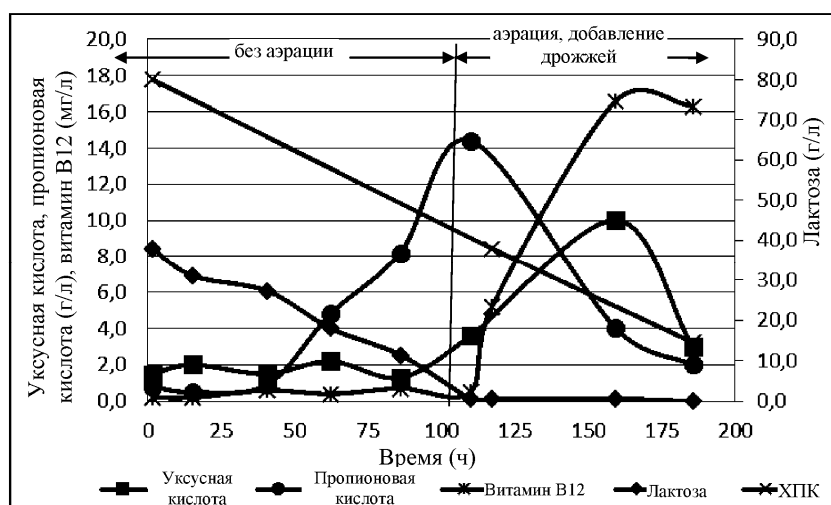
Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2