

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 698 529**

51 Int. Cl.:

**C12P 39/00** (2006.01)

**C12R 1/645** (2006.01)

**C12R 1/01** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.05.2015 PCT/EP2015/060270**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.11.2015 WO15169967**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.05.2015 E 15723471 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.08.2018 EP 3140416**

54 Título: **Cocultivo de propionibacterium y levadura**

30 Prioridad:

**09.05.2014 EP 14167774**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**05.02.2019**

73 Titular/es:

**ACIES BIO D.O.O. (50.0%)  
Tehnoloski park 21  
1000 Ljubljana, SI y  
ARIMA D.O.O. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**SVAGELJ, MIRJAN;  
FUJS, STEFAN;  
KOSEC, GREGOR y  
PETKOVIC, HRVOJE**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 698 529 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Cocultivo de propionibacterium y levadura

5 **Campo de la invención**

La presente invención se encuentra en el campo de la tecnología de bioprocesos, en particular, de bioprocesos que utilizan cocultivos de levadura y propionibacterium (es decir, *Propionibacterium sp.*).

10 **Antecedentes de la invención**

Las corrientes de desecho con una demanda química de oxígeno (DQO) orgánico elevada son una carga ecológica que debe tratarse en consecuencia. Estas corrientes de desecho pueden ser subproductos de diferentes industrias tales como las industrias lácteas, de frutas y hortalizas o del procesamiento de azúcar. Un ejemplo es el lactosuero que se produce en la industria láctea como subproducto resultante de la fabricación de queso. Este proceso da como resultado elevados volúmenes de lactosuero (dulce o agrio), que tiene una DQO elevada, pero que por otra parte no puede utilizarse fácilmente/económicamente de otra forma, debido al contenido relativamente reducido de contenido seco útil, por ejemplo, proteína de leche y lactosa.

20 Dependiendo del proceso de fabricación del queso, el valor de la DQO del lactosuero remanente puede variar de 35.000 mg de O<sub>2</sub>/l a 100.000 mg de O<sub>2</sub>/l. El principal contribuyente a la elevada carga orgánica es la lactosa, que puede representar hasta el 90 % del valor de la DQO. En el caso de lactosuero agrio, la presencia de ácido láctico incluso aumenta este problema. La lactosa también representa aproximadamente el 75 % de la materia seca del lactosuero y, como tal, puede explotarse mediante procesos que utilizan microorganismos. Se han estudiado  
25 diversas soluciones de utilización de lactosuero, tales como la producción de bioetanol y de biogás, la extracción de lactosa o proteínas, la producción de ácidos orgánicos o biomasa, pero existe aún la necesidad de una forma económica de utilización del lactosuero.

30 El documento WO 2011/140649 describe la utilización de lactosuero por un cultivo mixto de bacterias acidolácticas y levadura para la producción de biomasa comestible. El proceso puede reducir exitosamente la carga de DQO del lactosuero, pero el producto final tiene poco valor comercial.

35 El lactosuero puede utilizarse para el cultivo de bacterias del género *Propionibacterium sp.*, que pertenecen al orden de Actinomycetales (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1ª edición, 1986)). Los *Propionibacterium sp.* son productores conocidos de productos valiosos tales como ácidos orgánicos (ácido propiónico y acético), vitamina B12 y compuestos bifidogénicos. Aunque los *Propionibacterium sp.* pueden cultivarse exitosamente en lactosuero, no pueden reducir la carga de DQO satisfactoriamente dado que producen ácidos orgánicos que se acumulan en el lactosuero fermentado (gastado) y contribuyen significativamente a la carga de DQO final. En lo sucesivo, los términos "*Propionibacterium sp.*" y "propionibacterium" se utilizan de forma intercambiable.

40 Se sabe que los cocultivos de *Propionibacterium sp.* y otras bacterias son capaces de reducir la carga de DQO del medio gastado (Miyano et al., 2000), pero dichos procesos tienen la desventaja de no ser de calidad alimentaria y, como tales, su utilización está excluida dentro de las plantas de procesamiento de alimentos.

45 Se sabe que los metabolitos producidos por *Propionibacterium sp.* inhiben el crecimiento de otros microorganismos, especialmente hongos, y su uso en la prevención del deterioro de alimentos es bien conocido. El documento US 5.260.061 describe la aplicación de metabolitos de *Propionibacterium sp.* para aplicaciones alimentarias para inhibir el crecimiento de levadura. El documento WO 2008/030089 describe el cocultivo de *Propionibacterium sp.* con levadura con el fin de obtener características positivas de sabor/aroma en el proceso de fabricación de queso. En este caso, se utilizó *Propionibacterium sp.* para controlar y finalmente inhibir el crecimiento de levadura en el cultivo mixto, dado que la célula de levadura aplicada no era tolerante a sustancias inhibitorias del crecimiento producidas por *Propionibacterium sp.* Danilova et al. (Applied Biochemistry and Microbiology, 2006, 42(4): 378-383) describen el cocultivo de *Propionibacterium freudenreichii ssp. Shermanii* y *Sacharomyces cerevisiae*.

55 En vista de la técnica anterior mencionada anteriormente, un objeto de la invención es proporcionar bioprocesos novedosos para producir productos biotecnológicos valiosos a partir de lactosuero dulce o agrio en el que los medios de fermentación gastados finales muestren una DQO relativamente reducida. Otro objeto de la invención es proporcionar células fúngicas útiles en procesos de la invención.

60 **Sumario de la invención**

La presente invención cumple los objetivos indicados anteriormente proporcionando un proceso para producir un producto biotecnológico, comprendiendo dicho proceso el cocultivo de propionibacterium y una célula de levadura en un medio de cultivo, en el que dicha célula de levadura es capaz de crecer en un sobrenadante de fase estacionaria de un cultivo de propionibacterium;

5 en el que el sobrenadante de fase estacionaria de un cultivo de propionibacterium se obtiene preparando un cultivo de semilla de propionibacterium de primera etapa transfiriendo 100 µl de cultivo madre de Propionibacterium freudenreichii ATCC 6207 obtenido de la colección de cultivos a 50 ml de medio P1 según la tabla 1 e incubando durante 4 días a 35 °C sin aireación y sin agitación; transfiriendo después 15 ml del cultivo de semilla de esta  
10 primera etapa a un frasco de vidrio de 150 ml relleno con 135 ml de medio P2 según la tabla 2 e incubando durante 4 días a 35 °C sin aireación y sin agitación para obtener un cultivo de semilla de segunda etapa; utilizando después 100 ml del cultivo de semilla de segunda etapa así obtenido para inocular un biorreactor de tanque en agitación con 1 l de volumen de operación relleno con 900 ml de medio P3 según la tabla 3, siendo los parámetros del cultivo: temperatura: 35 ± 0,5 °C, pH: 6,5 ± 0,1 controlado con NaOH al 15 % o H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, agitación: 100 ± 10 rpm, con  
15 introducción de CO<sub>2</sub>: 0,1 ± 0,05 vvm, concentración de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>: 400 ± 100 mg/l, ajustada cada 12 horas utilizando (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 15 %, pH 6,5, realizándose la fermentación hasta que la concentración de lactosa sea inferior a 1 g/l, y en el que preferentemente al final de la fermentación la suma de las concentraciones de ácido acético y ácido propiónico en el caldo es superior o igual a 20 g/l; y centrifugando después 50 ml del caldo de fermentación así obtenido a 10.000 g y transfiriendo el sobrenadante a un matraz Erlenmeyer y esterilizando el mismo en autoclave a 121 °C durante 20 minutos, en el que el medio esterilizado en autoclave es el sobrenadante de fase estacionaria de un cultivo de propionibacterium.

20 Por lo tanto, la presente invención utiliza una célula de levadura capaz de crecer en un sobrenadante de fase estacionaria de un cultivo de propionibacterium.

25 Dicha célula de levadura puede obtenerse de forma reproducible mediante procedimientos de mutagénesis/selección descritos en la presente solicitud de patente. Las células de levadura que tienen la capacidad de crecer en un sobrenadante de fase estacionaria de un cultivo de *propionibacterium* son útiles para la reducción de la carga de DQO de materiales de desecho de procesos de fermentación según la invención. Dichas células de levadura no estaban disponibles hasta la fecha para el experto en la técnica.

30 Las células fúngicas útiles en la invención pueden identificarse y distinguirse fácilmente de otras células fúngicas mediante procedimientos divulgados en el presente documento más adelante. En particular, se divulgan en el presente documento un medio de cultivo bien definido y condiciones de cultivo de propionibacterium bien definidas para evaluar la capacidad de una célula fúngica de "crecer en un sobrenadante de fase estacionaria de un cultivo de propionibacterium" según la invención.

35 La capacidad de crecer en un sobrenadante de fase estacionaria de un cultivo de propionibacterium para el cultivo de levadura puede definirse en términos de una tasa de crecimiento máxima alcanzada por la célula de levadura cuando se cultiva en un sobrenadante de fase estacionaria de un cultivo de propionibacterium. Por lo tanto, en otra forma de realización preferida, dicha capacidad de crecimiento de dicha célula de levadura en un sobrenadante de fase estacionaria de un cultivo de propionibacterium se define como la capacidad de dicha célula fúngica de crecer en dicho sobrenadante de fase estacionaria a una tasa de crecimiento máxima ( $\mu_{max}$ ) de por lo menos 0,02 h<sup>-1</sup>. Los procedimientos para determinar la tasa de crecimiento de un microorganismo en cultivo son bien conocidos en la  
40 técnica.

45 El estado de cultivo estacionario de un cultivo de propionibacterium puede indicarse mediante una concentración constante de ácido acético y ácido propiónico en el medio de cultivo a lo largo del tiempo cuando el cultivo no está expuesto a aireación. En otra forma de realización, el estado estacionario del cultivo de propionibacterium se indica mediante una densidad celular constante de propionibacterium (en g(peso seco)/l) a lo largo del tiempo.

50 En una forma de realización preferida, la capacidad de la célula de levadura para crecer en un sobrenadante en estado estacionario de un cultivo de propionibacterium se evalúa en el procedimiento de ensayo descrito en el ejemplo 2, más adelante en el presente documento.

El producto biotecnológico es preferentemente uno que es producido por propionibacterium.

Un producto biotecnológico preferido es la vitamina B12.

55 En una forma de realización preferida, el proceso incluye una primera fase sin aireación seguida de una segunda fase en la que se produce la aireación. Preferentemente, ambas fases tienen una duración de por lo menos 24 horas, o 48 horas, o 72 horas.

60 En una forma de realización preferida, por lo menos el 90 % del crecimiento del propionibacterium [en % de gramos en peso seco] tiene lugar durante dicha primera fase sin aireación.

En otra forma de realización preferida, por lo menos el 90 % del crecimiento de la célula fúngica [en % de gramos en peso seco] tiene lugar durante dicha segunda fase en la que se produce la aireación.

65 En otra forma de realización preferida, la demanda de química oxígeno (DQO) del medio de cultivo se reduce a un nivel igual o inferior al 25 %, preferentemente igual o inferior al 10 %, o igual o inferior al 1 %, de la DQO inicial del

medio de cultivo.

En otra forma de realización preferida, el medio de cultivo es (o comprende) lactosuero. El medio de cultivo es o comprende, por ejemplo, lactosuero dulce o lactosuero agrio.

Preferentemente, en procesos de la invención, dicha célula de levadura se añade en el punto temporal en el que dicha propionibacterium ha alcanzado por lo menos el 90 % de su densidad celular máxima [g(peso seco)/l] en el cultivo o después del mismo. En otras formas de realización del proceso de la invención, la célula de levadura se añade cuando el propionibacterium ha alcanzado su fase de crecimiento estacionario, o después de ello.

La invención se refiere adicionalmente a un procedimiento de fabricación de una cepa de levadura tolerante con propionibacterium. El procedimiento comprende:

1. Obtener una cepa de levadura de partida.
2. Exponer la cepa de levadura de partida a un agente mutagénico y/o a una condición mutagénica.
3. Cultivar la cepa de levadura expuesta de la etapa 2 en presencia de primeras concentraciones de ácido acético y/o (preferentemente "y") ácido propiónico.
4. Opcionalmente exponer dicha cepa de levadura cultivada de la etapa 3 a un agente mutagénico y/o a una condición mutagénica y cultivar dicha cepa de levadura opcionalmente expuesta en presencia de segundas concentraciones de ácido acético y/o (preferentemente "y") ácido propiónico, siendo dichas segundas concentraciones preferentemente superiores a dichas primeras concentraciones, respectivamente.
5. Exponer la cepa de levadura cultivada de la etapa 3 o 4 a un agente mutagénico y/o a una condición mutagénica.
6. Cultivar la cepa de levadura expuesta de la etapa 6 en un medio que comprende sobrenadante de fase estacionaria de un cultivo de propionibacterium.
7. Opcionalmente repetir la etapa 7 con concentraciones crecientes del sobrenadante de fase estacionaria de un cultivo de propionibacterium.
8. Obtener de esta forma una célula de levadura capaz de crecer en un sobrenadante de fase estacionaria de un cultivo de propionibacterium.

Un agente mutagénico preferido según la invención es metanosulfato de etilo. No obstante, puede utilizarse cualquier otro agente mutagénico, es decir, químico o físico, que aumente la frecuencia de la aparición de mutaciones. Los agentes mutagénicos conocidos que pueden utilizarse en el procedimiento anteriores incluyen: especies de oxígeno reactivo (ROS), tales como superóxidos, radicales hidroxilo y peróxido de hidrógeno (PAH); agentes alquilantes tales como etilnitrosourea o metanosulfonato de etilo; guanina; nitrosaminas; nitrosoguanidina; gas mostaza; cloruro de vinilo; aminas aromáticas; amidas; 2-acetilaminofluoreno; alcaloide de plantas; tales como los de especies de Vinca; bromo; compuestos que contienen bromo en su estructura química; azida de sodio; benceno. Algunas condiciones mutagénicas adecuadas o mutágenos físicos son, por ejemplo, irradiación, exposición a rayos X y/o exposición a radiactividad.

El experto apreciará que las etapas 2 a 4 anteriores pueden omitirse, por ejemplo, si la cepa de partida de la etapa 1 es ya suficientemente tolerante a ácido acético y/o ácido propiónico, o capaz de otra forma de crecer en un medio que comprende sobrenadante de fase estacionaria de un cultivo de propionibacterium. En este caso la cepa de partida procedente de la etapa 1 se expone directamente al agente mutagénico y/o la condición en la etapa 5.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a la célula de levadura depositada el 20.1.2014 en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) con el número de acceso DSM 28271.

### Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra la utilización de lactosa por *Propionibacterium sp.* y la producción de ácido acético y propiónico y vitamina B12 en un proceso de dos etapas en lactosuero. De esta forma el valor de la DQO puede reducirse de 85000 mg de O<sub>2</sub>/l a 36000 mg de O<sub>2</sub>/l. Hasta 75 horas la fermentación se llevó a cabo sin aireación y después de 75 horas se introdujo la aireación.

La figura 2 muestra la utilización de lactosa por *Propionibacterium sp.* y la producción de ácido acético y propiónico y vitamina B12 en un proceso de dos etapas en lactosuero en el que el cultivo de levadura DSM 28271 tolerante se añadió en la etapa en la que se introdujo oxígeno. De esta forma el valor de la DQO puede reducirse de 85000 mg de O<sub>2</sub>/l a 13.000 mg de O<sub>2</sub>/l. Hasta 75 horas la fermentación se llevó a cabo sin aireación y después

de 75 horas se introdujo levadura y la aireación.

La figura 3 muestra una presentación esquemática de un bioproceso para el cocultivo de *Propionibacterium sp.* con levadura tolerante, según la invención.

La figura 4 muestra la utilización de lactosa por *Propionibacterium sp.* y la producción de ácido acético y propiónico y vitamina B12 en un proceso de dos etapas en lactosuero en el que el cultivo de levadura *K. lactis* ABLMKL6 tolerante se añadió en la etapa en la que se introdujo oxígeno. De esta forma el valor de la DQO puede reducirse de 80.000 mg de O<sub>2</sub>/l a 14.500 mg de O<sub>2</sub>/l. Hasta 112 horas la fermentación se llevó a cabo sin aireación y después de 112 horas se introdujo levadura y la aireación.

### Descripción detallada de la invención

La expresión "sobrenadante" o "sobrenadante del cultivo", en el contexto de la presente invención, significa el líquido obtenido al filtrar o centrifugar un caldo de fermentación, eliminando así células y otros materiales insolubles. El sobrenadante contiene cualesquiera nutrientes y otros componentes del medio de cultivo (aún) sin consumir por el microorganismo o productos de degradación, y cualesquiera productos producidos por el microorganismo durante la fermentación.

Se entenderá que "medio de cultivo" es un medio que contiene nutrientes en el que puede crecer un microorganismo. Se prefieren medios de cultivo líquidos.

Se entenderá que "caldo" o "caldo de fermentación" se refiere a un medio de cultivo en el que crece, o ha crecido, un microorganismo. Un caldo puede comprender nutrientes sin utilizar y/o productos producidos por el microorganismo.

Un "sobrenadante de fase estacionaria" o "medio gastado", según la presente invención, se entenderá que es un sobrenadante de un caldo de fermentación en fase estacionaria.

Como fase estacionaria se entenderá la fase del cultivo en la que el microorganismo ha cesado sustancialmente de crecer, por ejemplo, el microorganismo ha alcanzado su densidad celular máxima durante el cultivo. La fase estacionaria de un cultivo también puede detectarse realizando un seguimiento de la concentración de productos de fermentación. En una forma de realización, la fase estacionaria de un cultivo de propionibacterium se define como la fase que comienza en el punto temporal en el que la concentración de ácido acético y/o ácido propiónico ha alcanzado su valor máximo, o alternativamente ha alcanzado el 90 % de su valor máximo.

El "lactosuero" es un subproducto de la industria láctea que se separa de la leche después de cuajar cuando se añade o se forma *in situ* cuajo o una sustancia ácida. El "lactosuero dulce" se fabrica durante la fabricación de tipos de cuajo de queso duro tales como cheddar o queso suizo. El "lactosuero ácido" o "lactosuero agrio" es un subproducto producido durante la elaboración de productos lácteos de tipo ácido tales como requesón o labneh (queso de yogur).

Se entenderá que la "demanda química de oxígeno" o "DQO" es la demanda química de oxígeno determinada según el procedimiento de la norma ISO 6060:1989. Se entiende que una muestra puede tener que diluirse con agua si se determina que la DQO es superior a la DQO máxima permitida de 700 mg/l, según este procedimiento. La DQO se calcula entonces a partir de la DQO determinada multiplicando por el factor de dilución.

La presente invención utiliza células de levadura, tolerantes al cocultivo con propionibacterium. La presente invención proporciona un proceso de cocultivo de propionibacterium y una célula de levadura, célula que es tolerante a compuestos inhibidores producidos por propionibacterium.

La invención utiliza células de levadura que son capaces de crecer en presencia de propionibacterium y sus metabolitos inhibidores. Estas células se obtienen mediante procedimientos de selección de mutantes aleatorios de origen natural de células fúngicas disponibles en general en sustratos de crecimiento en los que se ha cultivado previamente propionibacterium. Preferentemente, la selección de dichas células de levadura tolerantes se lleva a cabo en por lo menos dos etapas. En la primera etapa se seleccionan mutantes aleatorios de células de levadura que pueden tolerar concentraciones elevadas de ácidos orgánicos, por ejemplo ácido acético y ácido propiónico. En la segunda etapa, se someten mutantes aleatorios de estas células tolerantes a ácido a una ronda adicional de selección en medio de crecimiento utilizado en el que se ha cultivado previamente propionibacterium y que ha alcanzado la fase estacionaria de crecimiento.

Las células de levadura utilizadas en la presente invención, que son tolerantes al cocultivo con propionibacterium, por ejemplo, capaces de crecer en un sobrenadante de fase estacionaria de un cultivo de propionibacterium, pueden obtenerse mediante procedimientos de selección clásicos, posiblemente respaldados por mutagénesis aleatoria, por ingeniería genética o mediante el cribado de aislados naturales.

Un proceso biotecnológico de la invención que utiliza células de levadura tolerantes en un proceso de cocultivo con

propionibacterium puede incluir las etapas siguientes:

1. Preparación del medio de cultivo
- 5 2. Inoculación con propionibacterium
3. Fermentación sin aireación
- 10 4. Cambio en las condiciones aeróbicas
5. Inoculación con una célula de levadura tolerante
6. Continuación de la fermentación como cocultivo de propionibacterium y levadura
- 15 7. Opcionalmente procesamiento posterior y recuperación del producto

***El medio de fermentación***

20 El medio de fermentación puede ser cualquier medio de fermentación adecuado en el que pueda crecer tanto propionibacterium como células de levadura. Por ejemplo, el medio de fermentación puede comprender melaza o lactosuero. El medio de fermentación puede estar compuestos por corrientes de desecho de diferentes industrias (tales como lactosuero) a las que pueden añadirse aditivos específicos (tales como minerales, vitaminas, nitrógeno y fuentes de carbono adicionales, precursores, etc.) para aumentar la tasa de crecimiento o la formación de productos deseados. El medio puede contener diferentes fuentes de carbono tales como glucosa, lactosa, fructosa, ácido láctico y fuentes de nitrógeno tales como sulfato de amonio, aminoácidos, péptidos y proteínas que son adecuadas para propionibacterium. El valor del pH del medio de fermentación puede ajustarse al comienzo del proceso o puede mantenerse durante el proceso de fermentación para permitir un buen crecimiento de propionibacterium y/o la formación de producto.

30 El medio se trata normalmente mediante un proceso para inactivar una proporción suficiente de microorganismos que estarían inicialmente presentes en el medio de fermentación, antes de la inoculación con propionibacterium. Estos procesos pueden ser esterilización/pasteurización, por ejemplo, esterilización en autoclave, filtración, irradiación y/o tratamientos químicos.

35 El recipiente de cultivo o fermentador debería prepararse mediante un procedimiento que posibilite la eliminación de una proporción suficiente de microorganismos presentes inicialmente y después rellenarlo con el medio de fermentación. El recipiente de cultivo que se va utilizar en procesos de la invención puede ser muy sencillo, siempre que pueda mantener una temperatura deseada, y pueda mantener una agitación adecuada para evitar gradientes de pH o nutrientes grandes. Puede retener idealmente una ligera sobrepresión.

40 ***Inoculación con propionibacterium***

45 La inoculación con propionibacterium puede consistir en una o más etapas dependiendo del volumen final de cultivo de semilla y del proceso utilizado. El inóculo puede prepararse en un medio que soporte el crecimiento de propionibacterium. El inóculo se cultiva a la temperatura preferida durante el tiempo deseado después del cual puede utilizarse para inocular el medio de fermentación. Los volúmenes de inoculación para etapas subsiguientes de la inoculación o la etapa de fermentación pueden variar del 1 al 20 %.

50 ***Fermentación sin aireación***

55 El caldo de fermentación se mantiene en primer lugar sin aireación a la temperatura deseada para el crecimiento óptimo o la formación de producto. La temperatura puede encontrarse en el intervalo de 25 °C a 40 °C, preferentemente a 35 °C. Si hay presencia de azúcares en el medio de fermentación, el valor del pH debería mantenerse al nivel deseado, que puede variar de 5,5 a 8,0, preferentemente de 6,5. El pH puede mantenerse mediante varios ácidos/bases diferentes tales como H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, HCl, NaOH, NH<sub>4</sub>OH, etc. El bioproceso puede llevarse a cabo sin aireación o puede mantenerse bajo introducción y/o sobrepresión de CO<sub>2</sub> y/o N<sub>2</sub>. Se favorece el cultivo bajo sobrepresión de CO<sub>2</sub>.

60 La agitación del medio de fermentación debería ser suficiente para evitar grandes gradientes de pH y puede realizarse, pero sin limitación, mediante turbinas de Rushton, hélices marinas o una bomba de recirculación interna y/o externa.

***Cambio a condiciones aeróbicas***

65 Después de que se agoten los nutrientes consumibles por propionibacterium, el cultivo puede cambiarse a condiciones aeróbicas. El aire puede introducirse en el recipiente de cultivo y debería ser suficiente para el

crecimiento de la levadura que se describe más adelante. La velocidad de aireación también influye en la velocidad a la que la levadura metaboliza ácidos orgánicos producidos por propionibacterium.

5 Pueden introducirse suplementos adicionales en este momento que influyen en las propiedades del caldo (es decir, antiespumante), influyen en la formación de productos producidos por propionibacterium (es decir, 5,6-dimetilbencimidazol) o influyen en el crecimiento o la formación de productos de levadura (fuentes de nitrógeno, precursores, etc.).

10 Después de haber cambiado el cultivo a condiciones aeróbicas, el pH debería mantenerse de nuevo al nivel deseado. El valor del pH puede variar de 5,5 a 8, preferentemente a 6,5 para permitir un crecimiento óptimo de la levadura.

#### **Inoculación de la célula de levadura tolerante con propionibacterium**

15 La inoculación de la célula de levadura tolerante puede consistir en una o varias etapas dependiendo del volumen final del cultivo de semilla. El inóculo de levadura se prepara en un medio que soporta el crecimiento de levadura. El inóculo se cultiva a la temperatura preferida durante el tiempo deseado. El inóculo de levadura puede utilizarse después para inocular el medio de fermentación con propionibacterium cultivado después de haberse cambiado a condiciones aeróbicas. Los volúmenes de inoculación para etapas subsiguientes del inóculo o la etapa final pueden variar, pero sin limitación, del 1 al 20 %. Preferentemente el inóculo de levadura representa el 5 % del volumen final.

#### **Continuación de la fermentación mediante el cocultivo de microorganismos resultante**

25 El caldo de fermentación se mantiene a la temperatura deseada y el valor del pH se mantiene constantemente al nivel deseado mediante la adición del ácido o la base apropiados. La agitación y la aireación debería mantenerse a niveles requeridos para asegurar la utilización completa de ácidos orgánicos. La cantidad de aireación y/o el mezclado influyen en el metabolismo de ácidos orgánicos por la levadura.

30 También pueden introducirse suplementos adicionales en este momento que influyen en las propiedades del caldo (es decir, antiespumante), influyen en la formación de productos producidos por propionibacterium o influyen en el crecimiento o la formación de producto de la levadura. El valor de DQO del sobrenadante del caldo de fermentación y el rendimiento de un producto valioso, producido por propionibacterium o por células de levadura, se supervisan para lograr las propiedades deseadas del caldo. Utilizando dicho procedimiento de cocultivo el valor de la DQO del sobrenadante del caldo puede reducirse a menos de 20000 mg de O<sub>2</sub>/l, preferentemente a menos de 15000 mg de O<sub>2</sub>/l, de forma más preferida a menos de 10000 mg de O<sub>2</sub>/l y de forma incluso más preferida a menos de 5000 mg de O<sub>2</sub>/l. Si el producto de valor elevado seleccionado es vitamina B12, el rendimiento de vitamina B12 puede ser superior a 5 mg/l, preferentemente superior a 10 mg/l, de forma más preferida superior a 20 mg/l y de forma incluso más preferida superior a 100 mg/l.

#### **Procesamiento posterior del caldo de fermentación**

40 Después de haber consumido los ácidos orgánicos y de que la DQO del sobrenadante alcance un nivel satisfactorio, el bioproceso se detiene. La biomasa mixta de propionibacterium/levadura conjuntamente con componentes insolubles del caldo puede separarse del sobrenadante por centrifugación, filtración o cualquier otro procedimiento adecuado. El sobrenadante tiene una DQO reducida y representa una carga pequeña si se lleva a una planta de tratamiento de agua o, en el caso ideal, la DQO es lo suficientemente baja como para poder desecharlo directamente en el medio ambiente. Si la biomasa está enriquecida con sustancias valiosas, tales como vitaminas y proteínas, en particular vitamina B<sub>12</sub>, estas sustancias pueden utilizarse como aditivo para alimentación animal. Como alternativa, la biomasa puede utilizarse como material de partida para el aislamiento de sustancias valiosas, tales como vitamina B<sub>12</sub> en cualquier forma (por ejemplo, cianocobalamina o metilcobalamina). Dependiendo del grado de pureza, la vitamina B<sub>12</sub> puede utilizarse como aditivo para alimentación animal o como suplemento farmacéutico o dietético para consumo humano.

55 La levadura utilizada según la invención puede ser del género *Kluyveromyces* (por ejemplo, *K. lactis*; *K. marxianus*), preferentemente *K. lactis*, y/o del género *Yarrowia*, preferentemente *Y. lipolytica*. No obstante, la cepa también puede ser del género *Debaryomyces* (por ejemplo, *Debaryomyces hansenii*), *Candida* (por ejemplo, *Candida versatilis*), *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Pichia*, *Trichosporon* (por ejemplo, *Trichosporon beigeli*), *Torulasporea*, *Issatchenkia* (por ejemplo, *Issatchenkia orientalis*), *Geotrichum*, *Saccharomyces* o *Zygosaccharomyces*. Dichas células están disponibles en la técnica y pueden obtenerse de instituciones de depósito o pueden aislarse a partir de productos alimentarios.

## **EJEMPLOS**

### **Ejemplo 1: Preparación de células de levadura tolerantes a propionibacterium**

65 La levadura *Candida utilis* NRRL Y-7586 se cultivó en medio YEPD que consistía en extracto de levadura (20 g/l),

peptona (20 g/l) y dextrosa (10 g/l) a 35 °C durante 72 horas, se lavó dos veces con tampón de fosfato 0,1 M (pH 7) y se expuso a una dosis adecuada de un agente mutagénico (metanosulfonato de etilo) para obtener una tasa de destrucción del 99,9 %. Puede utilizarse cualquier otra célula de levadura adecuada. Las células supervivientes se cultivaron en un medio que contenía extracto de levadura (10 g/l) y ácido acético y propiónico a la concentración inhibitoria mínima. Después de tres días de cultivo a 35 °C se transfirió una parte alícuota desde este caldo a medio YEPD, se dejó crecer durante 72 horas y se sometió a otra ronda de mutagénesis. Las células supervivientes se cultivan después en un medio que contiene extracto de levadura (10 g/l) y una concentración aumentada de ácido acético y propiónico (con respecto a la ronda previa). Este procedimiento se repitió iterativamente hasta que la levadura fuera capaz de tolerar concentraciones elevadas de ácidos acético y propiónico (es decir, levadura capaz de crecer y consumir ácido acético y propiónico en concentraciones de 15 g/l). De esta forma se obtuvo la cepa de *C. utilis* ABLMCU1.

Con la cepa de *C. utilis* resultante (ABLMCU1), que era tolerante a concentraciones elevadas de ácidos acético y propiónico, se utilizó un esquema de mutagénesis/selección similar, esta vez utilizando sobrenadante diluido de fase estacionaria de la fermentación de propionibacterium como agente inhibitorio. Con más detalle, las células de *C. utilis*, previamente seleccionadas para ser tolerantes a ácidos orgánicos, se cultivaron en medio YEPD, se sometieron a metanosulfonato de etilo y subsiguientemente se cultivaron en un medio que era una mezcla de sobrenadante de fase estacionaria obtenido de la fermentación de la cepa de *Propionibacterium freudenreichii* ABLM1700 en lactosuero (lactosuero, 5 g/l de extracto de levadura, 20 mg/l de  $\text{CoCl}_2$ , *Propionibacterium freudenreichii* cultivada durante 96 horas a 35 °C, sobrenadante denominado en adelante medio "As") y el medio utilizado para el desarrollo de células de levadura tolerantes a ácidos orgánicos (es decir, ácido acético (15 g/l), ácido propiónico (15 g/l) y extracto de levadura (10 g/l) (denominado en el presente documento medio "Bs"). Estos medios se mezclaron en una relación de As:Bs = 3:7, que era superior al nivel en el que las células de levadura ABLMCU1 eran capaces de crecer. Después de 72 horas se transfirió una parte alícuota del cultivo de *C. utilis* resultante a YEPD, se cultivó y de nuevo se expuso a metanosulfonato de etilo y subsiguientemente se transfirió a la mezcla de los medios As y Bs a una relación de As:Bs superior, a saber 4:6. Este procedimiento se repitió hasta que se obtuvieron colonias de levadura que eran tolerantes a sobrenadante sin diluir de fase estacionaria de una fermentación de propionibacterium (100 % de As). La cepa de levadura resultante se depositó el 14 de enero de 2014 en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) y está disponible con el número de acceso DSM 28271.

El procedimiento descrito anteriormente dio como resultado una cepa de *C. utilis* tolerante a propionibacterium. Debe indicarse, no obstante, que se utilizó un procedimiento similar exitosamente para producir otras cepas tolerantes a propionibacterium, es decir, partiendo de una cepa de levadura diferente. Por ejemplo, la cepa de *Kluyveromyces lactis* Y-17597 se trató mediante un procedimiento similar y dio como resultado cepas fúngicas tolerantes a propionibacterium (*K. lactis* ABLMKL6) según la invención. Se demostró que este procedimiento, de hecho, era reproducible y aplicable a otras cepas de levadura.

#### **Ejemplo 2: Ensayo para el establecimiento de la "capacidad para crecer en un sobrenadante de fase estacionaria de un cultivo de propionibacterium"**

El procedimiento siguiente es útil para determinar si una cepa fúngica, por ejemplo una cepa de levadura es "capaz de crecer en un sobrenadante de fase estacionaria de un cultivo de propionibacterium", según la reivindicación 1.

#### **Etapas 1: Obtención de un sobrenadante de fase estacionaria de un cultivo de propionibacterium**

Se prepara un cultivo de semilla de propionibacterium de primera etapa en medio P1 (tabla 1, más adelante) de la forma siguiente. Se transfieren 100  $\mu\text{l}$  de cultivo madre de propionibacterium, obtenido de la colección de cultivos (*Propionibacterium freudenreichii* ATCC 6207) a 50 ml de medio P1 y se incubó durante 4 días a 35 °C sin aireación y sin agitación.

Después se transfirieron 15 ml de este cultivo de semilla de primera etapa a un frasco de vidrio de 150 ml relleno con 135 ml de medio P2 (tabla 2, más adelante) y se incubaron durante 4 días a 35 °C sin aireación y sin agitación para obtener un cultivo de semilla de segunda etapa.

Después, 100 ml del cultivo de semilla de segunda etapa obtenido de esta forma se utiliza para inocular un biorreactor de tanque con agitación de un volumen de operación de 1 l relleno con 900 ml de medio P3 (tabla 3, más adelante). Los parámetros de cultivo son: temperatura:  $35 \pm 0,5$  °C, pH:  $6,5 \pm 0,1$  (controlado con NaOH al 15 % o  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), agitación:  $100 \pm 10$  rpm, introducción de  $\text{CO}_2$ :  $0,1 \pm 0,05$  vvm, concentración de  $\text{NH}_4^+$ :  $400 \pm 100$  mg/l (ajustada cada 12 horas utilizando  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  al 15 %, pH 6,5). La fermentación se lleva a cabo hasta que la concentración de lactosa sea inferior a 1 g/l. Al final de la fermentación, la suma de las concentraciones de ácido acético y ácido propiónico en el caldo es preferentemente superior o igual a 20 g/l.

Se centrifugan 50 ml del caldo de fermentación obtenido de esta forma a 10000 g y el sobrenadante se transfiere a un matraz Erlenmeyer y se esteriliza en autoclave a 121 °C durante 20 minutos. El medio esterilizado en autoclave es un "sobrenadante de fase estacionaria de un cultivo de propionibacterium".

**Etapa 2: Análisis de la capacidad para crecer en sobrenadante de fase estacionaria de un propionibacterium**

Se prepara un inóculo de la célula fúngica que se va a analizar añadiendo 100 µl de un cultivo madre a 10 ml de medio Y1 (Tabla 4). El cultivo de inóculo se incuba en un agitador rotatorio a 35 °C y 200 rpm durante 72 horas. El cultivo resultante se utiliza como el "inóculo fúngico" en las etapas siguientes.

El matraz Erlenmeyer esterilizado en autoclave que contiene el sobrenadante de fase estacionaria obtenido en la etapa 1 anterior se inocula con 2,5 ml del inóculo fúngico y se incuba en un agitador rotatorio a 35 °C y 200 rpm. El valor inicial del pH se ajusta a pH 6,5. Esto se considera el "cultivo de ensayo".

El crecimiento del hongo se evalúa midiendo los cambios en el pH del cultivo después de 24 horas de cultivo. En una forma de realización, se considera que una célula fúngica analizada es "capaz de crecer en un sobrenadante de fase estacionaria de un propionibacterium", dentro del significado de la reivindicación 1 adjunta, si el valor del pH del caldo en el cultivo de ensayo aumenta del pH inicial (pH 6,5) a un valor del pH de 8,0 o superior después de 24 h de periodo de cultivo.

En consecuencia, la célula fúngica analizada puede considerarse que no es capaz de crecer en un sobrenadante de fase estacionaria de un cultivo de propionibacterium si el valor del pH del caldo en el cultivo de ensayo permanece inferior a 8,0 después de 24 h de periodo de cultivo.

La célula fúngica reivindicada que es capaz de crecer en un sobrenadante de fase estacionaria de un cultivo de propionibacterium es preferentemente una evaluada como positiva en el ensayo anterior.

**Ejemplo 2 b): Ensayos alternativos**

Como alternativa, el crecimiento del hongo puede evaluarse midiendo cambios de DO del cultivo después de 24 horas de cultivo.

Una célula fúngica analizada puede considerarse capaz de crecer en un sobrenadante de fase estacionaria de un cultivo de propionibacterium, dentro del significado de la reivindicación 1 adjunta, si la diferencia de la densidad óptica (medida a 620 nm) del caldo aumenta en por lo menos 0,5 dentro de un periodo de 24 h después de la inoculación. Como alternativa, una célula fúngica analizada se considera capaz de crecer en un sobrenadante de fase estacionaria de un cultivo de propionibacterium, dentro del significado de la reivindicación 1 adjunta, si la tasa de crecimiento máxima ( $\mu_{max}$ ) de la célula fúngica en el cultivo de ensayo es igual a 0,02 h<sup>-1</sup> o superior.

En consecuencia, una célula fúngica analizada se considera que no es capaz de crecer en un sobrenadante de fase estacionaria de un cultivo de propionibacterium, dentro del significado de la reivindicación 1 adjunta, si la diferencia de la densidad óptica (medida a 620 nm) del caldo se aumenta en menos de 0,5 dentro de un periodo de 24 h después de la inoculación. Como alternativa, una célula fúngica analizada se considera que no es capaz de crecer en un sobrenadante de fase estacionaria de un cultivo de propionibacterium, dentro del significado de la reivindicación 1 adjunta, si la tasa de crecimiento máxima ( $\mu_{max}$ ) de la célula fúngica en el cultivo de ensayo es inferior a 0,02 h<sup>-1</sup>.

En consecuencia, la célula fúngica reivindicada que es capaz de crecer en un sobrenadante de fase estacionaria de un cultivo de propionibacterium es una evaluada como positiva en uno de los ensayos alternativos anteriores.

Tabla 1: Medio P1 definido para propionibacterium

Ingrediente	Cantidad
Tripticasa (BBL)	10 g
Extracto de levadura (Difco)	10 g
DL-lactato de sodio (Sigma)	10 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Sigma)	2,5 g
MnSO <sub>4</sub> (Sigma)	0,05 g
Agua destilada	hasta 1000 ml
El pH se ajusta a 7,0 con NaOH/HCl	
Autoclave durante 20 minutos a 121 °C a 1,2 bar	

Tabla 2: Medio P2 definido para propionibacterium

Ingrediente	Cantidad
Glucosa (Sigma)	40 g
DL-lactato de sodio (Sigma)	40 g
Extracto de levadura (Biolife)	10 g
CaCO <sub>3</sub> (Sigma)	10 g
CoCl <sub>2</sub> (Sigma)	10 mg
D-pantotenato de calcio* (Sigma)	20 mg
Agua destilada	hasta 1000 ml
El pH se ajusta a 7,0 con NaOH/HCl	
Autoclave durante 20 minutos a 121 °C a 1,2 bar	

\* Añadido después de la esterilización

Tabla 3: Medio P3 para propionibacterium

5

Ingrediente	Cantidad
Polvo de lactosuero dulce**	60 g/l
Extracto de levadura (Biolife)	5 g/l
D-pantotenato de calcio* (Sigma)	40 mg/l
Autoclave durante 20 minutos a 121 °C a 1,2 bar	

\* Añadido después de la esterilización

\*\* Polvo de lactosuero dulce de calidad alimentaria con las especificaciones siguientes: lactosa min. 63 % en peso, proteína min. 10 % en peso, humedad max. 5 % es adecuado y puede obtenerse de diferentes proveedores tales como: Hoogwegt International (Países Bajos), Lactalis Ingredients (Francia), James Farrell & Co (Estados Unidos).

Tabla 4: Medio Y1 para levadura

Ingrediente	Cantidad
Bacto-peptona (Biolife)	20 g
Extracto de levadura (Biolife)	10 g
Glucosa (Sigma)	20 g
Agua destilada	hasta 1000 ml
Autoclave durante 20 minutos a 121 °C a 1,2 bar	

### 10 **Ejemplo 3: Cocultivo eficaz de propionibacterium y levadura**

#### **i) Preparación del inóculo de propionibacterium**

15 El inóculo de propionibacterium se preparó en dos etapas. Una suspensión madre de 0,5 ml de *Propionibacterium freudenreichii* ABLM2475 (podría haberse utilizado cualquier otra cepa productora de vitamina B12, tal como *Propionibacterium freudenreichii* ATCC6207) se inoculó en 50 ml del primer medio vegetativo (20 g/l de extracto de levadura y 20 g/l de DL-lactato) y se incubó durante 4 días a 35 °C. La primera etapa vegetativa se transfirió a 400 ml del medio vegetativo de segunda etapa (40 g/l de glucosa, 40 g/l de extracto de levadura, 40 g/l de DL-lactato, 10 g/l de carbonato de calcio, 20 mg/l de cloruro de cobalto, 10 mg/l de pantotenato) y se cultivó durante 4 días

20 neutralizándose mientras el valor del pH continuamente con hidróxido de sodio. La totalidad de la segunda etapa se transfirió después al biorreactor final.

#### **ii) Preparación del inóculo de levadura tolerante**

25 El inóculo de levadura tolerante se preparó también en dos etapas. Una suspensión madre de 0,5 ml de la levadura DSM 28271 se inoculó en 50 ml del primer medio vegetativo (40 g/l de extracto de levadura, 40 g/l de peptona y 10 g/l de glucosa) en un matraz Erlenmeyer de 250 ml y se incubó durante 2 días a 35 °C sobre un agitador rotatorio a

220 rpm. La primera etapa vegetativa se transfirió después a 200 ml del mismo medio en un matraz Erlenmeyer de 1000 ml y se cultivó durante 2 días a 35 °C sobre un agitador rotatorio a 220 rpm.

### iii) Fermentación

Un biorreactor con un volumen de operación de 7 l se rellenó con 4 l de lactosuero agrio (la DQO era de 80.000 mg de O<sub>2</sub>/l) suplementado con extracto de levadura (5 g/l) y cloruro de cobalto (20 mg/l) y se esterilizó durante 1 hora a 121 °C. Después de enfriar a 35 °C se añadió pantotenato (10 mg/l) y el biorreactor se inoculó con cultivo de semilla de propionibacterium. La temperatura de cultivo fue de 35 °C y la velocidad de agitación de 100 rpm. El contenido del biorreactor se burburjeó con CO<sub>2</sub> gaseoso (10 ml/min) y el pH se mantuvo a 6,5 (con NaOH). Después de 90 horas el lactato y la lactosa se habían consumido y se produjeron aproximadamente 8 y 15 g/l de ácido acético y ácido propiónico. En ese momento se añadieron 20 mg/l de 5,6-dimetilbencimidazol, la velocidad de agitación se aumentó a 500 rpm y se introdujo aireación a 1 vvm y el biorreactor se inoculó con el 5 % de la levadura tolerante. El valor del pH se mantuvo a 6,5 (con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Después de 48 horas todos los ácidos orgánicos se habían consumido por la levadura y la fermentación se detuvo. El proceso proporcionó 15 mg/l de vitamina B12. La biomasa que consistía en propionibacterium y levadura se retiró por centrifugación y el valor de la DQO del sobrenadante resultante fue de 12.000 mg de O<sub>2</sub>/l, un 85 % de reducción.

Un diagrama de flujo esquemático del proceso ejemplar se muestra en la figura 3.

#### **Ejemplo 4: Cocultivo eficaz de propionibacterium y levadura (*K. lactis* ABLMKL6)**

##### **i) Preparación del inóculo de propionibacterium**

El inóculo de propionibacterium se preparó en dos etapas. Una suspensión madre de 0,5 ml de *Propionibacterium freudenreichii* ABLM2475 (podría haberse utilizado cualquier otra cepa productora de vitamina B12, tal como *Propionibacterium freudenreichii* ATCC6207) se inoculó en 50 ml del primer medio vegetativo (extracto de levadura 20 g/l y DL-lactato 20 g/l) y se incubó durante 4 días a 35 °C. La primera etapa vegetativa se transfirió a 400 ml del medio vegetativo de segunda etapa (40 g/l de glucosa, 40 g/l de extracto de levadura, 40 g/l de DL-lactato, 10 g/l de carbonato de calcio, 20 mg/l de cloruro de cobalto, 10 mg/l de pantotenato) y se cultivó durante 4 días neutralizándose mientras el valor del pH continuamente con hidróxido de sodio. La totalidad de la segunda etapa se transfirió después al biorreactor final.

##### **ii) Preparación del inóculo de levadura tolerante**

El inóculo de levadura tolerante se preparó también en dos etapas. Una suspensión madre de 0,5 ml de la levadura *K. lactis* ABLMKL6 se inoculó en 50 ml del primer medio vegetativo (40 g/l de extracto de levadura, 40 g/l de peptona y 10 g/l de glucosa) en un matraz Erlenmeyer de 250 ml y se incubó durante 2 días a 35 °C sobre un agitador rotatorio a 220 rpm. La primera etapa vegetativa se transfirió después a 200 ml del mismo medio en un matraz Erlenmeyer de 1000 ml y se cultivó durante 2 días a 35 °C sobre un agitador rotatorio a 220 rpm.

### iii) Fermentación

Un biorreactor con un volumen de operación de 7 l se rellenó con 4 l de lactosuero agrio (la DQO era de 80.000 mg de O<sub>2</sub>/l) suplementado con extracto de levadura (5 g/l) y cloruro de cobalto (20 mg/l) y se esterilizó durante 1 hora a 121 °C. Después de enfriar a 35 °C se añadió pantotenato (10 mg/l) y el biorreactor se inoculó con cultivo de semilla de propionibacterium. La temperatura de cultivo fue de 35 °C y la velocidad de agitación de 100 rpm. El contenido del biorreactor se burbujeó con CO<sub>2</sub> gaseoso (10 ml/min) y el pH se mantuvo a 6,5 (con NaOH). Después de 112 horas el lactato y la lactosa se habían consumido y se produjeron aproximadamente 4 y 14 g/l de ácido acético y ácido propiónico. En ese momento se añadieron 20 mg/l de 5,6-dimetilbencimidazol, la velocidad de agitación se aumentó a 500 rpm y se introdujo aireación a 1 vvm y el biorreactor se inoculó con el 5 % de la levadura tolerante. El valor del pH se mantuvo a 6,5 (con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Después de 72 horas todos los ácidos orgánicos se habían consumido por la levadura y la fermentación se detuvo. El proceso proporcionó 16 mg/l de vitamina B12. La biomasa que consistía en propionibacterium y levadura se retiró por centrifugación y el valor de la DQO del sobrenadante resultante fue de 14,500 mg de O<sub>2</sub>/l, un 81 % de reducción.

## REIVINDICACIONES

1. Proceso para producir un producto biotecnológico, comprendiendo dicho proceso el cocultivo de propionibacterium y una célula de levadura en un medio de cultivo, en el que dicha célula de levadura es capaz de crecer en un sobrenadante de fase estacionaria de un cultivo de propionibacterium;
- 5
- en el que el sobrenadante de fase estacionaria de un cultivo de propionibacterium se obtiene preparando un cultivo de semilla de propionibacterium de primera etapa transfiriendo 100 µl de cultivo madre de Propionibacterium freudenreichii ATCC 6207 obtenido de la colección de cultivos a 50 ml de medio P1 según la tabla 1 e incubando durante 4 días a 35 °C sin aireación y sin agitación; transfiriendo después 15 ml del cultivo de semilla de esta primera etapa a un frasco de vidrio de 150 ml relleno con 135 ml de medio P2 según la tabla 2 e incubando durante 4 días a 35 °C sin aireación y sin agitación para obtener un cultivo de semilla de segunda etapa; utilizando después 100 ml del cultivo de semilla de segunda etapa así obtenido para inocular un biorreactor de tanque en agitación con 1 l de volumen de operación relleno con 900 ml de medio P3 según la tabla 3, siendo los parámetros del cultivo: temperatura: 35 ± 0,5 °C, pH: 6,5 ± 0,1 controlado con NaOH al 15 % o H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, agitación: 100 ± 10 rpm, con introducción de CO<sub>2</sub>: 0,1 ± 0,05 vvm, concentración de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>: 400 ± 100 mg/l, ajustada cada 12 horas utilizando (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 15 %, pH 6,5, realizándose la fermentación hasta que la concentración de lactosa sea inferior a 1 g/l, y en el que preferentemente al final de la fermentación la suma de las concentraciones de ácido acético y ácido propiónico en el caldo es superior o igual a 20 g/l; y centrifugando después 50 ml del caldo de fermentación así obtenido a 10.000 g y transfiriendo el sobrenadante a un matraz Erlenmeyer y esterilizando el mismo en autoclave a 121 °C durante 20 minutos, en el que el medio esterilizado en autoclave es el sobrenadante de fase estacionaria de un cultivo de propionibacterium.
- 10
2. El proceso de la reivindicación 1, en el que la célula de levadura es del género Kluyveromyces, Yarrowia, Debaryomyces, Candida, Cryptococcus, Rhodotorula, Pichia, Trichosporon, Torulaspora, Issatchenkia o Geotrichum.
- 15
3. El proceso de la reivindicación 1, en el que la célula de levadura es del género Kluyveromyces o Candida.
- 20
4. El proceso de la reivindicación 1, en el que la célula de levadura es de la especie Kluyveromyces lactis o Candida utilis.
- 25
5. El proceso de la reivindicación 1, en el que la célula de levadura es de la especie Kluyveromyces lactis.
- 30
6. El proceso de la reivindicación 1, en el que la célula de levadura es la célula de levadura depositada el 20 de enero de 2014 en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Braunschweig, Alemania, y está disponible con el número de acceso DSM 28271.
- 35
7. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicho producto biotecnológico se produce mediante dicho propionibacterium.
- 40
8. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho producto biotecnológico es vitamina B12.
- 45
9. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dicho proceso incluye una fase sin aireación seguida de una fase aeróbica.
- 50
10. El proceso de la reivindicación 9, en el que por lo menos el 90 % del crecimiento del propionibacterium [en % en gramos de peso seco] tiene lugar durante la fase sin aireación.
- 55
11. El proceso de la reivindicación 9 o 10, en el que por lo menos el 90 % del crecimiento de la célula de levadura [en % en gramos de peso seco] tiene lugar durante la fase aeróbica.
12. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que la demanda química de oxígeno (DQO) del medio se reduce a un nivel igual o inferior al 25 %, preferentemente igual o inferior al 10 %, de la DQO inicial del medio de cultivo.
- 60
13. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que dicho medio de cultivo comprende lactosuero.
- 65
14. Un procedimiento de producción de una cepa de levadura tolerante a propionibacterium que comprende las etapas de:
- 1) obtener una cepa de levadura de partida;
  - 2) exponer la cepa de levadura de partida a un agente mutagénico y/o a una condición mutagénica;

## ES 2 698 529 T3

3) cultivar la cepa de levadura expuesta de la etapa 2 en presencia de primeras concentraciones de ácido acético y/o ácido propiónico;

5 4) opcionalmente exponer dicha cepa de levadura cultivada de la etapa 3 a un agente mutagénico y/o a una condición mutagénica y cultivar dicha cepa de levadura opcionalmente expuesta en presencia de segundas concentraciones de ácido acético y/o ácido propiónico, siendo dichas segundas concentraciones preferentemente superiores a dichas primeras concentraciones, respectivamente;

10 5) exponer la cepa de levadura cultivada de la etapa 3 o 4 a un agente mutagénico y/o a una condición mutagénica;

6) cultivar la cepa de levadura expuesta de la etapa 5 en un medio que comprende sobrenadante de fase estacionaria de un cultivo de propionibacterium y

15 7) opcionalmente repetir la etapa 6 con concentraciones crecientes del sobrenadante de fase estacionaria de un cultivo de propionibacterium;

20 8) obtener de esta forma una célula de levadura capaz de crecer en un sobrenadante de fase estacionaria de un cultivo de propionibacterium.

15. La célula de levadura depositada el 20 de enero de 2014 en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Braunschweig, Alemania, y disponible con el número de acceso DSM 28271.

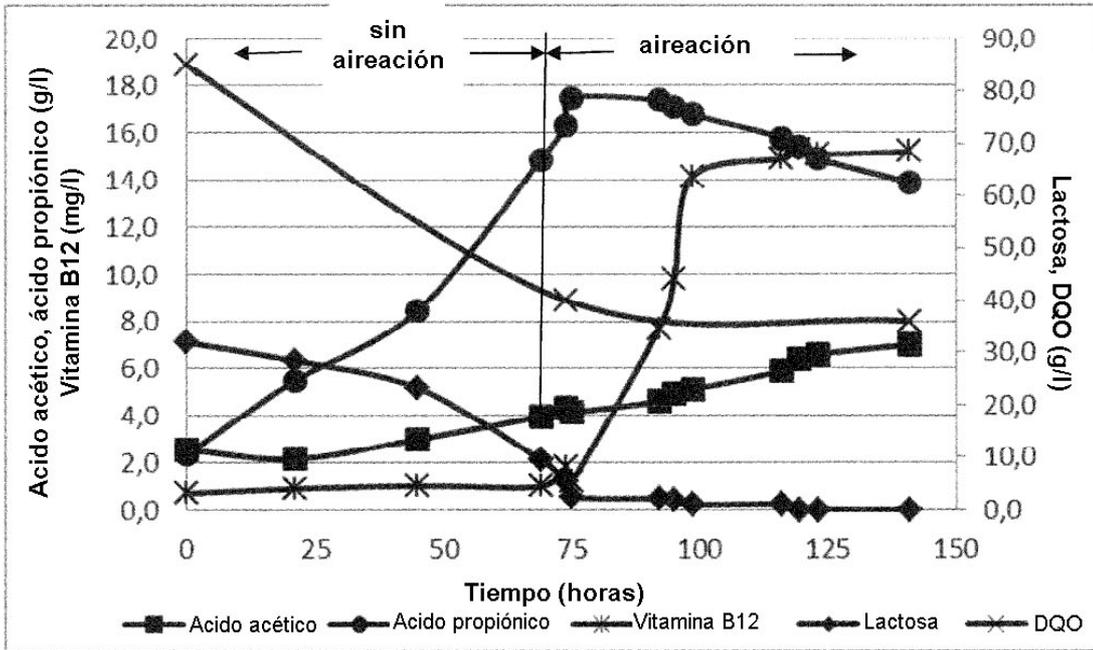


FIG. 1

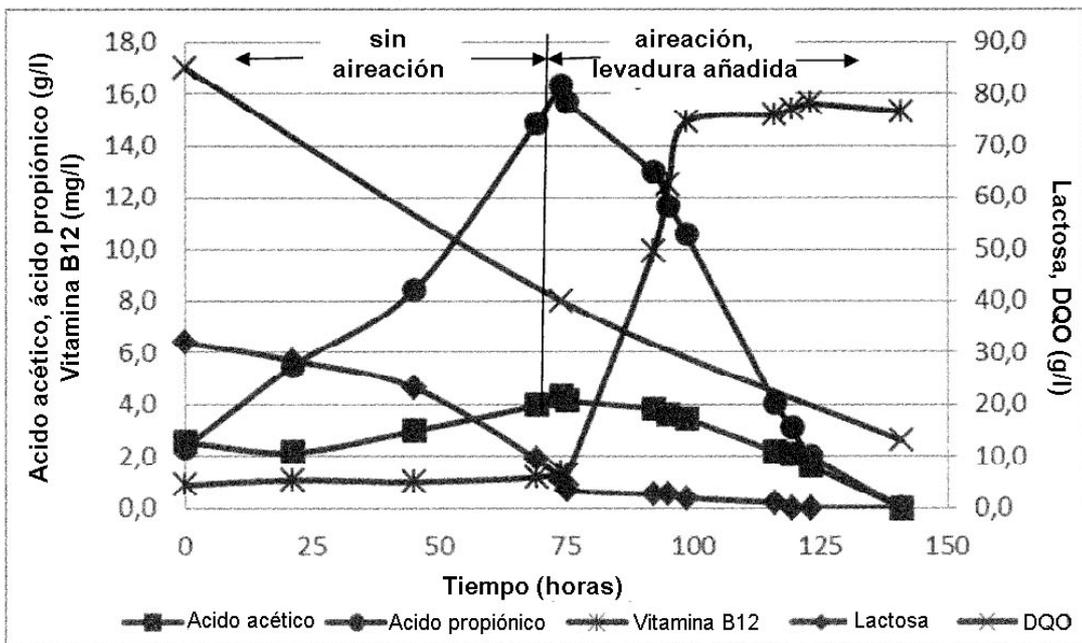
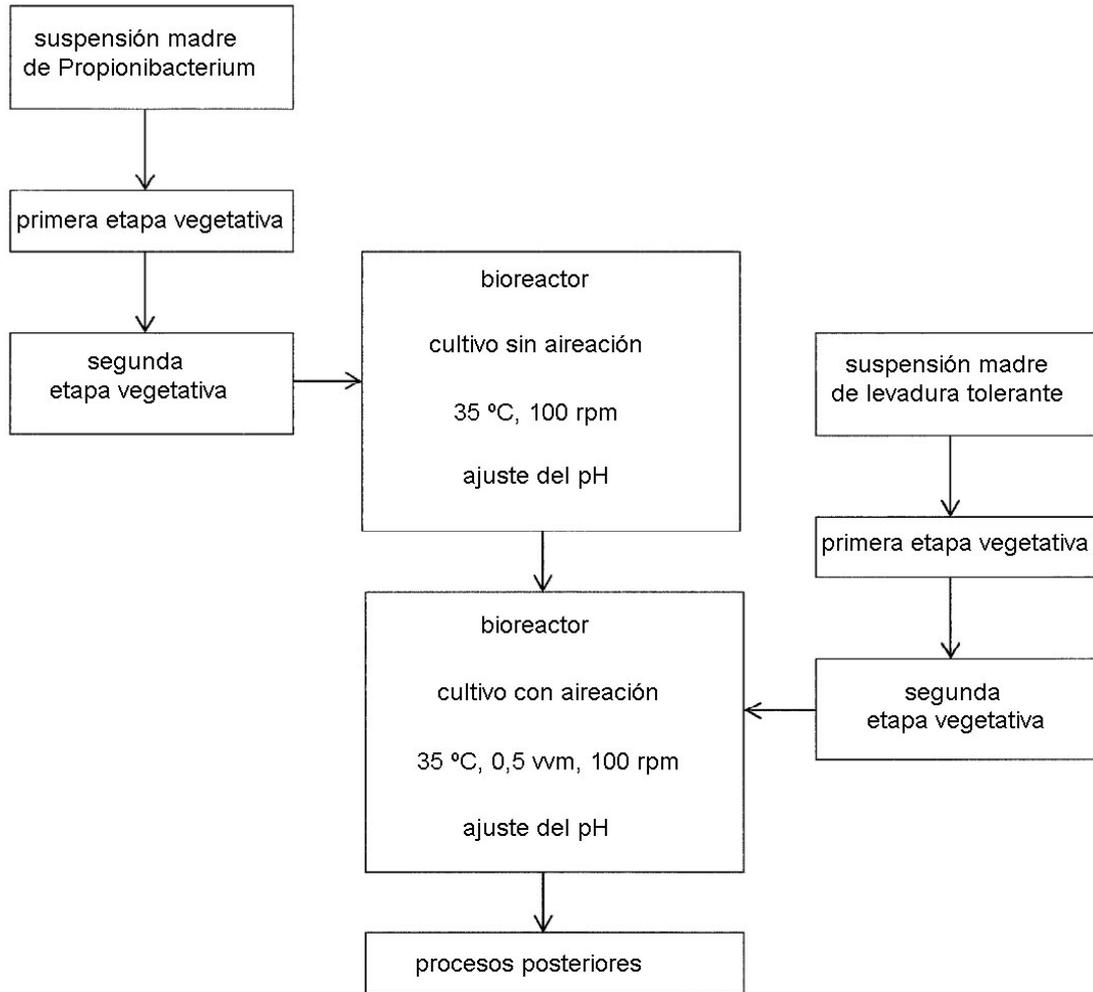


FIG. 2



**FIG. 3**

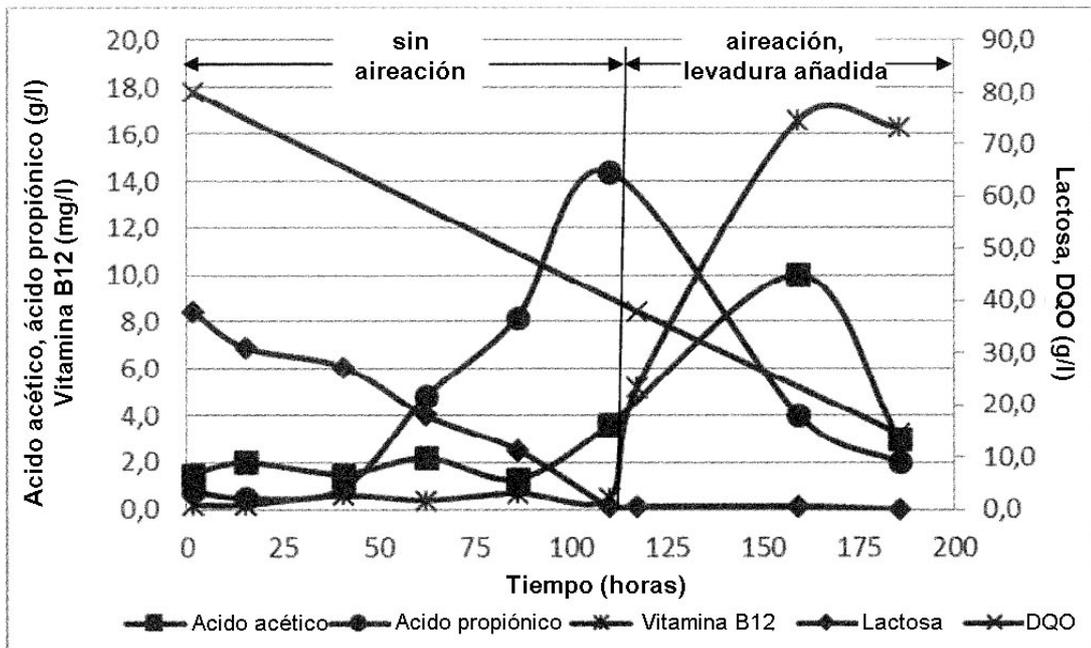


FIG. 4