



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 102 481** ⁽¹³⁾ **C1**
(51) МПК⁶ **C 12 P 7/60, 39/00, C 12 N 1/20**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

(21), (22) Заявка: 5011214/13, 31.01.1992
(30) Приоритет: 13.06.1991 EP 91.810451.4
(46) Дата публикации: 20.01.1998
(56) Ссылки: JP, акцептованная заявка, 40154, 2(4) - 40/223/, 1976. Acta Microbiologica sinica, v. 21(2), 1981, p. 185 - 191. EP, патент, 0221707, кл. C 12 P 7/64, 1987. EP, патент, 0278447, кл. C 12 P 7/60, 1988. Biotechnology, edited by H.-J.Rehm and G.Reed, published by Verlag Chemie, Weinheim, Germany, 1984, v. 6a, p. 436 - 437.

(71) Заявитель:
Ф.Хоффманн-Ля Рош, АГ (CH)
(72) Изобретатель: Тацуко Хошино[JP],
Сетуко Ойима[JP], Терухиде Сугисава[JP]
(73) Патентообладатель:
Ф.Хоффманн-Ля Рош, АГ (CH)

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ 2-КЕТО-L-ГУЛОНОВОЙ КИСЛОТЫ ИЛИ ЕЕ СОЛИ

(57) Реферат:

Использование: биотехнология, получение продуктов микробиологического синтеза. Сущность изобретения: получение 2-кетог-Л-гулоновой кислоты или ее соли путем ферментативной конверсии D-сорбита заключается в том, что культивируют культуру микроорганизма (А), обладающего способностью к продуцированию L-сорбозы из D-сорбита и принадлежащего к роду Gluconobacter и Acetobacter, и микроорганизма (В), обладающего способностью к продуцированию 2-кетог-Л-гулоновой кислоты из L-сорбита и представляющего собой фактически штамм Gluconobacter oxydans DSM N 4025, при этом указанное культивирование проводят в среде, содержащей D-сорбит, а указанные два микроорганизма совместно присутствуют в

среде в течение по крайней мере части полного периода культивирования. В качестве микроорганизма (А) используют определенные штаммы, относящиеся к Gluconobacter suboxydans, Gluconobacter gluconicus, Gluconobacter albidus, Gluconobacter cerinus, Acetobacter acetixylinum. Процесс ведут обычно при pH 5 - 8, температуре 18 - 33°C и концентрации сорбита 20 - 120 г/л в питательной среде. 2-Кетог-Л-гулоновая кислота, полученная данным способом, может быть выделена и очищена стандартными методами, и получена в виде соответствующей соли, например соли натрия, калия, кальция, аммония или т. п., которая затем может быть использована непосредственно для конверсии в L-аскорбиновую кислоту. 4 з.п. ф-лы, 3 табл.



RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 102 481** ⁽¹³⁾ **C1**
(51) Int. Cl.⁶ **C 12 P 7/60, 39/00, C 12 N 1/20**

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 5011214/13, 31.01.1992

(30) Priority: 13.06.1991 EP 91.810451.4

(46) Date of publication: 20.01.1998

(71) Applicant:

F.Khoffmann-Lja Rosh, AG (CH)

(72) Inventor: Tatsuko Khoshino[JP],

Setuko Ojima[JP], Terukhide Sugisava[JP]

(73) Proprietor:

F.Khoffmann-Lja Rosh, AG (CH)

(54) **METHOD OF 2-KETO-L-GULONIC ACID OR ITS SALT PREPARING**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology. SUBSTANCE: 2-keto-L-gulonic acid or its salt is prepared by enzymatic conversion of D-sorbitol. Method involves culturing microorganism of genus Gluconobacter and Acetobacter showing capability to produce L-sorbose from D-sorbitol and microorganism showing capability to produce 2-keto-L-gulonic acid from L-sorbitol (strain Gluconobacter oxidans DSM N 4025). Culturing is carried out on medium containing D-sorbitol and the indicated two microorganisms in medium for complete culturing period. The following

microorganisms were used: Gluconobacter suboxydants, Gluconobacter gluconicus, Gluconobacter albidus, Gluconobacter cerinus, Acetobacter acetixylinum. Process is carried out at pH = 5-8, at 18-33 C, at sorbitol concentration 20-120/l in nutrient medium. 2-Keto-L-gulonic acid can be isolated and purified by the known methods and obtained as a corresponding salt (for example, sodium, potassium, calcium, ammonium salt) which can be used then for conversion to L-ascorbic acid directly. EFFECT: improved method of preparing. 5 cl, 3 tbl

RU 2 102 481 C1

RU 2 102 481 C1

2-кето-L-гулоновой кислоты с помощью штамма, продуцирующего 2-кето-L-гулоновую кислоту. При этом образование побочных продуктов в основном отсутствует.

В указанном выше способе микроорганизм (А), способный продуцировать L-сорбозу из D-сорбита, принадлежит к роду *Acetobacter* или *Gluconobacter*, а микроорганизм (В), способный продуцировать 2-кето-L-гулоновую кислоту из L-сорбозы, является штаммом DSM N 4025.

В способе может быть использован любой продукт, полученный в результате выделения из клеток микроорганизмов (А) и (В), таких как покоящиеся клетки, лиофилизированные клетки или иммобилизованные клетки.

Способ может быть осуществлен различными методами, например методом, в котором микроорганизмы (А) и (В) одновременно инокулируют в среду в начале культивирования; методом, в котором сначала инокулируют микроорганизм (А), а затем инокулируют микроорганизм (В) после периода культивирования; и методом, в котором оба микроорганизма (А) и (В) инокулируют отдельно в соответствующие среды, а затем один из них добавляют в питательную среду другого сразу, через некоторое время или через продолжительное время после периода культивирования, с последующим дополнительным культивированием.

В способе согласно изобретению может быть использован любой подходящий метод культивирования микроорганизмов. В соответствии со свойствами отдельных микроорганизмов может быть изменен способ смешивания указанных микроорганизмов. Так, например, отношение количества одного из инокулируемых микроорганизмов к другому, а также время инокуляции предпочтительно выбирать и определять с учетом степени роста соответствующих микроорганизмов, способности продуцировать L-сорбозу и способности конвертировать эту L-сорбозу в 2-кето-L-гулоновую кислоту. Необходимо также учитывать свойства используемых сред. В некоторых случаях могут быть использованы продукты, полученные в результате обработки клеток.

Микроорганизм (А), используемый в способе, может быть выбран из штаммов, находящихся на хранении в коллекциях культур, где они могут быть выданы по первому требованию, например в Институте Ферментации в Осаке (Япония, IFO). Ниже приводится список таких штаммов.

Примеры микроорганизмов (А)

Gluconobacter suboxydans IFO 3130
Gluconobacter suboxydans IFO 3255
Gluconobacter suboxydans IFO 3256
Gluconobacter suboxydans IFO 3257
Gluconobacter suboxydans IFO 3258
Gluconobacter suboxydans IFO 3289
Gluconobacter suboxydans IFO 3290
Gluconobacter suboxydans IFO 3291
Gluconobacter gluconicus IFO 3171
Gluconobacter gluconicus IFO 3285
Gluconobacter gluconicus IFO 3286
Gluconobacter rubiginosus IFO 3244
Gluconobacter albidus IFO 3251
Gluconobacter albidus IFO 3253
Gluconobacter industrius IFO 3261
Gluconobacter cerinus IFO 3262
Gluconobacter cerinus IFO 3263
Gluconobacter cerinus IFO 3265

Gluconobacter cerinus IFO 3266
Gluconobacter cerinus IFO 3267
Gluconobacter cerinus IFO 3270
Gluconobacter diaceticus IFO 3273
Gluconobacter roseus IFO 3990

- 5 *Acetobacter aceti* subsp. *orleans* IFO 3259
Acetobacter aceti subsp. *aceti* IFO 3281
Acetobacter liquefaciens IFO 12257
Acetobacter liquefaciens IFO 12258
Acetobacter liquefaciens IFO 12388
- 10 *Acetobacter aceti* subsp. *xylinum* IFO 3288
Acetobacter aceti subsp. *xylinum* IFO 13693
Acetobacter aceti subsp. *xylinum* IFO 13772
Acetobacter aceti subsp. *xylinum* IFO 13773
Используемый в способе настоящего изобретения микроорганизм (В) имеет следующие признаки:
- 15 негативный тест на оксидазу; окисление этанола с образованием уксусной кислоты; окисление D-глюкозы с образованием D-глюконовой кислоты и 2-кето-D-глюконовой кислоты; кетогенез полиспиртов; дигидроацетон, в основном, не продуцируется из глицерина; 2-кето-D-глюконовая кислота продуцируется из D-глюконовой кислоты, но не продуцируется из D-глюкозы, D-фруктозы, D-глюконовой кислоты, D-маннита или 2-кето-D-глюконовой кислоты; полиморфное отсутствие жгутиков; коричневые пигменты, образующиеся от D-фруктозы; наблюдается хороший рост при культивировании совместно с *Bacillus megaterium* или ее клеточным экстрактом; чувствительность к стрептомицину.
- 20
- 25 Предпочтительным микроорганизмом (В) является микроорганизм, находящийся на хранении в Немецкой коллекции микроорганизмов в Геттингене под номером DSM N 4025 от 17 марта 1987 года, согласно Будапештскому договору (адрес указанного депозитария: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D-3300 Braunschweig, Federal Republic of Germany). Этот микроорганизм относится к виду
- 30 *Gluconobacter oxydans*.
- 35 Предпочтительно при осуществлении способа вышеуказанные микроорганизмы (А) и (В) инокулируются вместе и культивируются в среде, содержащей D-сорбит и клетки микроорганизма, например покоящиеся клетки или любой обработанный продукт, полученный из клеток, который может быть использован для непосредственного воздействия на D-сорбит. Для культивирования микроорганизмов могут быть использованы любые стандартные способы, а особенно предпочтительным является способ
- 40
- 45 глубинной ферментации с аэрированием и размешиванием. Предпочтительные результаты получаются при культивировании с использованием жидкой питательной среды.
- 50 Для культивирования микроорганизмов (А) и (В) может быть использована любая подходящая питательная среда без каких-либо конкретных ограничений, в частности такой средой может быть водная питательная среда, включающая источник углерода и источник азота. Для инкубирования микроорганизмов желательно также использовать другие неорганические соли, а также небольшие количества питательных веществ. Питательные вещества, которые обычно используют для лучшего роста микроорганизмов, вводятся в
- 55
- 60

среду инкубирования.

Кроме того, к D-сорбиту, используемому в настоящем изобретении в качестве исходного материала, могут быть добавлены другие источники углерода, например глицерин, D-глюкоза, D-маннит, D-фруктоза, D-арабит и тому подобные.

В качестве источников азота могут быть использованы различные органические или неорганические вещества, такие как мясной экстракт, пептон, казеин, жидкий кукурузный экстракт, мочевины, аминокислоты, нитраты, соли аммония и тому подобные. В качестве неорганических соединений могут быть использованы сульфат магния, фосфат натрия, хлорид железа (II) и хлорид железа (III), карбонат кальция и т.п.

Количество каждого ингредиента питательных веществ и их отношение варьирует в зависимости от видовых свойств микроорганизмов, количества исходного материала, то есть D-сорбита, количества одного инокулированного микроорганизма по отношению к другому, времени инокулирования и других условий инкубации, и могут быть определены в каждом конкретном случае.

Концентрация исходного материала, то есть D-сорбита, также варьирует в зависимости от видовых и других свойств используемых микроорганизмов. D-сорбит может быть добавлен в среду целиком в начале культивирования, либо частями в течение периода культивирования. В способе настоящего изобретения наилучшие результаты дает добавление D-сорбита частями. В основном используемая концентрация D-сорбита составляет около 20-250 г/л, а более предпочтительная концентрация составляет приблизительно 50-200 г/л в целом.

Условия культивирования могут также варьировать в зависимости от вида и свойств используемых микроорганизмов, а состав среды определяется в каждом конкретном случае с целью наиболее эффективного получения нужного выхода продукта; при этом в основном температура культивирования составляет около 13-36°C, а предпочтительно около 18-33°C, а pH среды обычно составляет около 4,0-9,0, предпочтительно около 6,0-8,0. Как правило, период культивирования может продолжаться от 20 до 80 ч, в течение которых продуцируется наибольшее количество нужного продукта в среде.

Для поддержания значения pH среды в целях обеспечения наибольшей ферментной активности в указанную среду добавляют соответствующее количество кислотного или основного агента в соответствующий момент времени периода культивирования. Альтернативно для достижения указанной цели в начале культивирования в среду вводят соответствующий буфер или буферный агент.

2-кето-L-гулоновая кислота, полученная описанным выше способом, может быть выделена и очищена стандартными методами и преобразована в соответствующую соль, например соль натрия, калия, кальция, аммония и т.п. Соль может быть превращена в свободную кислоту стандартными способами.

Выделение продукта осуществляется с помощью любой комбинации с повторением

соответствующих стадий, например путем образования соли или при использовании различий в свойствах между продуктом и присутствующими примесями, таких как растворимость, абсорбционная способность, и отличий по коэффициенту распределения между растворителями. Для выделения продукта обычно используют стандартный способ адсорбции, например, на ионообменной смоле. Полученный таким образом продукт может быть подвергнут дальнейшей обработке, например, путем перекристаллизации или хроматографии.

Полученная описанным способом 2-кето-L-гулоновая кислота или ее соль может быть затем использована непосредственно для конверсии в L-аскорбиновую кислоту путем этерификации с последующей энолизацией и лактонизацией.

Настоящее изобретение иллюстрируется следующими примерами.

Пример 1

Микроорганизмом (B) является штамм DSM N 4025, а в качестве микроорганизма (A) используют микроорганизмы, представленные ниже в табл. 1.

Приготовление посевной культуры

Посевную культуру получают двумя различными методами, описанными ниже.

Метод 1. В пробирку (18 мм x 200 мм) загружают 5 мл культуральной среды (SCM): D-сорбит 2% дрожжевой экстракт (Oriental Yeast) 0,3% говяжий экстракт 0,3% жидкий кукурузный экстракт 0,3% полипептон 1,0% мочевины 0,1% KH_2PO_4 0,1% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,02% CaCO_3 0,1% (pH 7,0 перед стерилизацией), стерилизуют в автоклаве при 121°C в течение 20 мин. Затем в пробирку инокулируют одну петлю микроорганизма (A) и одну петлю микроорганизма (B) и инкубируют, вращая (220 об/мин), при 30°C в течение 1 дня.

Метод 2. Пробирку (18 мм x 200 мм), содержащую 5 мл культуральной среды SCM, инокулируют одной петлей микроорганизма (B) и одной петлей микроорганизма (A), и культивируют при вращении в течение 1 дня при 30°C. Одну каплю полученной культуры наносят на агаровую культуральную среду, содержащую 2% агара в среде SCM, и инкубируют в течение 4 дней при 30°C. Микроорганизмы, выращенные на агаровой культуре в виде смеси, используют непосредственно в качестве инокулята для следующей жидкой культуры. Пробирку, содержащую 5 мл среды SCM, инокулируют петлей смеси, полученной, как описано выше, и инкубируют, вращая со скоростью 220 об/мин, в течение 1 дня при 30°C.

Основной процесс ферментации

5 мл полученных отдельных посевных культур засевают в 500-мл колбу Эрленмейера, содержащую 50 мл продуктивной питательной среды (PM): D-сорбит 8% жидкий кукурузный экстракт 1% мочевины 1,5% (стерилизованная отдельно); KH_2PO_4 0,1% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01% CaCO_3 0,6% и противовспениватель 0,1% (pH 7,0 перед стерилизацией), инкубируют при 30 °C в течение 4 дней, вращая со скоростью 180 об/мин. В табл. 1 систематизированы результаты количественного определения 2-кето-L-гулоновой кислоты в культуральной питательной среде, проведенного с помощью

жидкостной хроматографии высокого разрешения.

Пример 2.

Посевные культуры *Gluconobacter suboxydans* IFO 3255 и штамма DSM N 4025 получают способом, аналогичным описанному в примере 1. Концентрации клеток *Gluconobacter suboxydans* IFO 3255 и штамма DSM N 4025 в посевных культурах составляют $3,7 \cdot 10^{10}$ кл./мл и $5,4 \cdot 10^8$ кл./мл соответственно.

Каждую полученную посевную культуру засевают в 50 мл среды РМ в 500-мл колбы Эрленмейера при полном объеме инокулята 10% (об./об.), где отношение (% об. /об.) между *Gluconobacter suboxydans* IFO 3255 и штаммом DSM N 4025 в посевном материале выриворвали следующим образом: 0:10, 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5: 5, 6:4, 7:3, 8:2, 9:1 и 10:0. Колбы инкубируют 4 дня при 30 °С. Результаты представлены в табл. 2. При отношении концентраций штамма DSM N 4025 и *Gluconobacter suboxydans* IFO 3255, составляющем 1:9 4:6, количество продуцируемой 2-кето-L-гулоновой кислоты составляло 63,8 г/л 66,6 г/л, исходя из 80 г/л D-сорбита (степень конверсии: 74,9 78,1 М%); причем аккумуляции 2-кето-L-глюконовой кислоты не наблюдалось.

Пример 3

В качестве микроорганизма (А) используют *Gluconobacter suboxydans* IFO 3255 и *Gluconobacter gluconicus* IFO 3285, а в качестве микроорганизма (В) используют штамм DSM N 4025. Отдельную посевную культуру (200 мл) получают методом 2, описанным в примере 1. Полученную посевную культуру (200 мл) засевают в 3-литровый ферментер, содержащий около 1,7 л сбраживаемой среды: D-сорбит 8% 10% или 12% дрожжевой экстракт 0,5% жидкий кукурузный экстракт 2,5% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,0086% мочевины 0,086 (стерилизованная отдельно); KH_2PO_4 0,086% и противовспениватель 0,15% Стерилизуют при 121°С в течение 20 мин. После инокуляции объем с культурой доводят до 2 л путем добавления стерилизованной воды. Ферментацию проводят при 30 °С, вращая со скоростью 700 об/мин, и при аэрации 1 л/мин. Значение pH культуры (7,0) поддерживают с помощью 4 н. Na_2CO_3 . Результаты представлены в табл. 3.

Пример 4

Способом, аналогичным описанному в примере 3, посевную культуру (200 мл) смеси *Gluconobacter suboxydans* IFO 3255 и штамма DSM N 4025 инокулируют в трехлитровый ферментер, содержащий 8% D-сорбита в сбраживающей среде, после чего рабочий объем доводят до 2 л путем добавления стерилизованной воды. Ферментацию начинают при тех же условиях, что и в примере 3. При этом отдельно приготавливают флакон (500 мл), загруженный 300 мл питательной среды: 120 г D-сорбита, 10 г дрожжевого экстракта, 50 г жидкого кукурузного экстракта, 0,172 г KH_2PO_4 , 1,72 г мочевины (стерилизованной отдельно) и 2,5 г противовспенивателя. Во время ферментации вышеуказанную питательную среду непрерывно подают в ферментер со скоростью 15 мл/ч в период

ферментации от 12 до 18 ч, со скоростью 60 мл/ч в период между 18 и 21 ч, со скоростью 4,3 мл/ч в период между 21 и 28 ч при помощи перистальтического насоса. В результате из 276 г D-сорбита было получено 224 г 2-кето-L-гулоновой кислоты при степени конверсии 76,1 М% за 51 ч ферментации.

Пример 5

Одну петлю *Gluconobacter suboxydans* IFO 3255 инокулируют в 500-мл колбу Эрленмейера, содержащую 100 мл среды SCM, и инкубируют при 30°С в течение 1 дня. Затем 10 мл полученной культуры переносят в колбу Эрленмейера на 500 мл, содержащую 100 мл среды SCM, и инкубируют при 30°С в течение 1 дня. В целом было получено 1,5 л посевной культуры *Gluconobacter suboxydans* IFO 3255. С другой стороны, одну петлю штамма DSM N 4025 инокулируют в колбу Эрленмейера на 500 мл, содержащую 100 мл среды для посевной культуры: L-сорбоза 8% глицерин 0,05% мочевины 0,5% (стерилизованная отдельно); жидкий кукурузный экстракт 1,75% хлебопекарные дрожжи (Oriental Yeast) 5,0% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,25% $CaCO_3$ 1,5% и противовспениватель 0,1% (pH 7,0 перед стерилизацией). Инкубируют 1 день при 30°С на роторной качалке (180 об/мин). 10 мл полученной таким образом культуры инокулируют в 100 мл той же среды и инкубируют 1 день при 30°С. В целом было получено 1,5 л посевной культуры штамма DSM N 4025. В 50-литровый ферментер загружают 25 л среды для ферментации: D-сорбит 8% жидкий кукурузный экстракт 5% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,01% KH_2PO_4 0,025% и противовспениватель 0,17% и стерилизуют 30 мин при 121°С. Обе посевные культуры (1,5 л каждая) инокулируют одновременно и полный объем культуры доводят до 30 л путем добавления стерилизованной воды. Ферментацию осуществляют при 30 °С с размешиванием со скоростью 400 об/мин и при аэрации 20 л/мин. pH культуры поддерживают при 7,0 с использованием 6,25 н. NaOH. Отдельно пятилитровый сосуд загружают 4 л питательной среды, содержащей 1800 г D-сорбита, 150 г жидкого кукурузного экстракта, 1,29 г $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 7,5 г KH_2PO_4 , 25 г противовспенивателя, и стерилизуют 20 мин при 120°С. Через 12 ч культивирования питательную среду непрерывно подают в ферментер со скоростью 222 мл/ч в течение 18 ч при помощи перистальтического насоса. Через 45,5 ч культивирования получают 36,8 л сбраживаемой среды, содержащей 93,5 г/л 2-кето-L-гулоновой кислоты. Другими словами, из 4200 г D-сорбита получают 3441 г 2-кето-L-гулоновой кислоты с выходом 76,8 М%

Пример 6

Сбраживаемую среду (3,68 л), полученную в соответствии с описанием примера 5, центрифугируют для удаления клеточного и других седиментов. Супернатант (2 л), содержащий 93,5 г/л 2-кето-L-гулоновой кислоты, концентрируют при пониженном давлении и при 45°С до получения объема около 1 л. Во время концентрации наблюдают образование белого осадка. Затем в концентрат добавляют 100 мл этанола и

оставляют на 1 день при 10 °С. Полученные в результате осадки собирают фильтрацией, промывают небольшим количеством 50%-ного холодного этанола и осушают при комнатной температуре и пониженном давлении. В качестве первого сбора получают 137,6 г моногидрата моносодиевой 2-кето-L-гулоновой кислоты с чистотой 99,14%. Маточный раствор концентрируют при пониженном давлении до около 400 мл, затем добавляют около 100 мл этанола и раствор оставляют на 24 ч при 10 °С. В результате этого получают в качестве второго сбора 71,9 г моногидрата моносодиевой соли 2-кето-L-гулоновой кислоты (с чистотой 85,04%).

Пример 7

Супернатант (0,5 л), полученный в соответствии с описанием в примере 6, пропускают через Amberlite IR-120 (H-type) (Rohm and Haas Company) и осушают при пониженном давлении. К осушенному материалу (около 50 г) добавляют 400 мл метанола и 0,5 мл 98% серной кислоты. Затем смесь нагревают 2 ч при 90 °С, метанол удаляют, а остаток промывают небольшим количеством метанола и осушают. Осушенный остаток суспендируют в 150 мл метанола и нагревают при дефлегмации с 10 г метилата натрия. Полученные кристаллы охлаждают, фильтруют и осушают при пониженном давлении. В результате получают 35,1 г натриевой L-аскорбиновой кислоты.

Формула изобретения:

1. Способ получения 2-кето-L-гулоновой кислоты или ее соли, предусматривающий ферментативную конверсию ее предшественника путем культивирования в питательной среде, содержащей этот предшественник, смешанной культуры микроорганизмов, включающей штамм *Gluconobacter oxydans* DSM N 4025, с последующим выделением целевого

продукта, отличающийся тем, что культивирование проводят в среде, содержащей D-сорбит, а наряду с вышеуказанным микроорганизмом используют микроорганизм, способный к продуцированию L-сорбозы из D-сорбита и принадлежащий к группе, состоящей из *Gluconobacter Suboxydans*, *Gluconobacter gluconicus*, *Gluconobacter albidus*, *Gluconobacter cerinus*, *Acetobacter liquefaciens*, *Acetobacter acetii* subsp. *xylinum*, причем процесс ведут таким образом, что оба из указанных микроорганизмов совместно присутствуют в среде в течение по крайней мере части полного периода культивирования, составляющего 20-80 ч, при этом оба микроорганизма одновременно вносят в питательную среду в начале культивирования или сначала вносят продуцирующий L-сорбозу из D-сорбита, а затем *Gluconobacter suboxydans* DSM N 4025 или оба микроорганизма инокулируют отдельно, а затем один из них добавляют в культуральную среду второго сразу, порционно или непрерывно после некоторого периода культивирования с последующим совместным культивированием.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что в качестве микроорганизма, способного к продуцированию L-сорбозы из D-сорбита, используют штамм *Gluconobacter suboxydans* IFO 3255, или 3256, или 3258, или 3290, или 3291, или штамм *Gluconobacter cerinus* IFO 3267, или штамм *Gluconobacter gluconicus* IFO 3285.

3. Способ по пп.1 и 2, отличающийся тем, что D-сорбит используют в концентрации 20-120 г/л, предпочтительно 80 г/л.

4. Способ по пп.1-3, отличающийся тем, что культивирование проводят при pH 5,0-8,0, предпочтительно при pH около 7,0.

5. Способ по пп.1-4, отличающийся тем, что культивирование проводят при 18-33 °С, предпочтительно при 30 °С.

Таблица 1

Микроорганизм А	2-кето-Л-гулоновая кислота (г/л), полученная с использованием посевной культуры	
	Метод 1	Метод 2
<i>Gluconobacter suboxydans</i> IFO 3255	64,1	65,2
<i>Gluconobacter suboxydans</i> IFO 3256	51,4	56,9
<i>Gluconobacter suboxydans</i> IFO 3258	45,2	58,8
<i>Gluconobacter suboxydans</i> IFO 3289	57,1	61,8
<i>Gluconobacter suboxydans</i> IFO 3290	11,4	65,9
<i>Gluconobacter suboxydans</i> IFO 3291	63,7	64,9
<i>Gluconobacter gluconicus</i> IFO 3171	46,9	58,9
<i>Gluconobacter gluconicus</i> IFO 3285	67,8	69,1
<i>Gluconobacter gluconicus</i> IFO 3286	59,9	26,4
<i>Gluconobacter albidus</i> IFO 3251	5,1	55,6
<i>Gluconobacter albidus</i> IFO 3253	53,4	55,6
<i>Gluconobacter cerinus</i> IFO 3263	56,0	38,2
<i>Gluconobacter cerinus</i> IFO 3265	44,9	26,1
<i>Gluconobacter cerinus</i> IFO 3267	58,6	58,0
<i>Gluconobacter cerinus</i> IFO 3270	59,3	28,3
<i>Acetobacter liquefaciens</i> IFO 12258	27,9	9,6
<i>Acetobacter liquefaciens</i> IFO 12388	25,0	18,9
<i>Acetobacter aceti</i> subsp. <i>xylinum</i> IFO 3288	32,6	35,2
None	2,1	1,7

Таблица 2

Инокулят: отношение Микроорганизма (А) ¹ к Микроорганизму (В) ²	Продуцируемое количество: (г/л)		
	2-KGA ³	2-KD ⁴	L-сорбоза
10:0	0	0	73,7
9:1	63,9	0	0
8:2	66,6	0	0
7:3	65,9	0	0
6:4	64,5	0	0
5:5	59,2	2,2	0
4:6	63,1	1,6	0
3:7	18,9	18,9	0
2:8	6,7	18,3	0
1:9	5,2	19,1	0
0:10	1,1	8,4	0

Примечание: 1. *Gluconobacter suboxydans* IFO 3255
 2. Штамм DSM № 4025
 3. 2-кето-L-гулоновая кислота
 4. 2-кето-D-глюконовая кислота

Таблица 3

Микроорганизм (А)	Начальная концентрация D-сорбита (%)	Продуцируемое количество (г/л)		
		2-KGA ¹	2-KD ²	L-сорбоза
<i>Gluconobacter suboxydans</i> IFO 3255	8	65,3	0	0
	10	77,1	0	0
	12	81,3	0	11,6
<i>Gluconobacter gluconicus</i> IFO 3285	8	66,4	0	0
	10	62,8	0	0
	12	61,5	1,8	29,6

Примечание: 1. 2-кето-L-гулоновая кислота
 2. 2-кето-D-глюконовая кислота