



NORGE

(12) PATENT

(19) NO

(11) 320889

(13) B1

(51) Int Cl.

C12P 7/56 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20001764	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1998.10.13 PCT/US98/21542
(22)	Inng.dag	2000.04.05	(85)	Videreføringsdag	2000.04.05
(24)	Løpedag	1998.10.13	(30)	Prioritet	1997.10.14, US, 949420
(41)	Alm.tilgj	2000.06.13			
(45)	Meddelt	2006.02.06			
(73)	Innehaver	Cargill Inc, P O Box 5624, MN55440-5624 MINNEAPOLIS, US			
(72)	Oppfinner	Ting Liu Carlson, Dayton, OH, US Eugene Max Peters Jr, Dayton, OH, US			
(74)	Fullmektig	Onsagers AS, Postboks 6963 St Olavs Plass, 0130 OSLO, NO			

(54)	Benevnelse	Fremgangsmåte for fremstilling av melkesyre.			
(56)	Anførte publikasjoner	GB-A-2251864, JP-A-62044188, US-A-4769329			
(57)	Sammendrag				

Fremgangsmåte for å produsere melkesyre som omfatter inkubering av syre-tolerante laktat-produserende mikroorganismer, slik som syretolerante homolaktiske bakterier, i næringsstoffmedium for å produsere en fermenteringskraft med høye nivåer av fri melkesyre er tilveiebragt. Isolerte syre-tolerante homolaktiske bakterier som er i stand til å produsere høye nivåer av fri melkesyre er også tilveiebragt.

Den foreliggende oppfinnelsen vedrører en fremgangsmåte for fremstilling av melkesyre.

5 Melkesyre og dens salter er lenge blitt benyttet i en rekke anvendelser i kjemiske, kosmetiske, matvare- og farmasøytiske industrier. I den senere tid har nye bioteknologiske materialer basert på laktat, slik som bionedbrytbare laktid-polymerer, ført til et øket behov for laktat og spesielt for den frie syreformen av enten L- eller D-laktat. Anvendelsen av melkesyre i produksjonen av forskjellige industrielle polymerer er blitt beskrevet f.eks. i U.S. Patenter: 5,142,023; 5,247,058; 10 5,258,488; 5,357,035; 5,338,822; 5,446,123; 5,539,081; 5,525,706; 5,475,080; 5,539,026; 5,484,881; 5,585,191; 5,536,807; 5,247,059; 5,274,073; 5,510,526; og 5,594,095.

Mens kjemiske prosesser kan anvendes for å produsere melkesyre, fører den økende kostnaden av petrokjemiske råvarer og behovet for å løse den racemiske laktat-blandingens produsert ved konvensjonelle kjemiske metoder at fermenteringsmetoder 15 blir et attraktivt alternativ for fremstillingen av laktat anrikt i en av dens optiske isomerer. Prosessen som anvendes for å produsere bionedbrytbare laktidpolymerer krever typiske den frie syreformen av enten L- eller D-laktat som et startmateriale. Uheldigvis kan, som med de fleste organiske syrefermenteringer, sluttprodukt-inhiberingen av den organiske syren (melkesyre i dette tilfellet) være et stort hinder 20 for effektiv fermentering. Bakteriestammer som typisk anvendes i laktatfermenteringen kan inhiberes ved lav pH i tillegg til laktatkonsentrasjonen. For å overvinne dette problemet er industrielle laktatfermenteringsprosesser typisk kjørt ved en høyere pH, f.eks. ved minst 5.0 og ofte ved eller over 6.0. Dette resulterer i produksjonen av et laktatprodukt som er i alt vesentlig til stede fullstendig i formen 25 av et salt. Ytterligere prosessstrinn er typisk nødvendig for å fjerne det kationiske anionet og isolere den ønskede fri melkesyren. Siden høye konsentrasjoner av visse salter, f.eks. natriumkationer, kan ha en inhiberende effekt på fermentering, kan typen og/eller mengden av salt tilstede også påvirke effektiviteten av 30 fermenteringen.

Produksjonen av racemisk laktat fra maisstivelse med lavt enzyminnhold ved anvendelse av *Lactobacillus amylovorus* har blitt rapportert. Cheng et al., *J. Ind. Microbiol.*, 7:27-34 (1991). Mens relativt høye produksjonsnivåer ved pH så lav som 4.2 har blitt rapportert, gir ikke denne fermenteringen laktat anrikt i begge 35 optiske isomerer.

En rekke måter for å forbedre effektiviteten av laktatfermenteringer har blitt rapportert. Flere av disse omfatter fjerning av fri melkesyre fra fermenteringskraften på en kontinuerlig basis. For eksempel har elektrolyse blitt anvendt for å redusere sluttproduktinhiberingen ved fjerning av laktat fra fermenteringskraften. Den høye 40 kostnaden av dialysemembraner koblet med en lav laktatgradient har generelt senket det attraktive ved denne metoden. Ioneutbytte og anvendelsen av polyvinylpyridin

for å fjerne laktat fra fermenteringsmediumet har også blitt rapportert. En annen metode som ble beskrevet ganske nylig omfatter en flertrinns ekstraksjonsprosedyre. Denne prosessen omfatter en ekstraksjon av laktat fra kraften med et tertiært amin i et forsøk på å holde kraftens pH i å falle til en verdi som inhiberer ytre laktatproduksjon. De rapporterte laktatproduksjonsnivåene som er oppnådd via denne metoden er imidlertid fortsatt ganske lave. Benyttelse av denne metode kan også kreve at den ekstraherte fermenteringskraften utsettes for en andre ekstraksjon for å minst redusere restkonsentrasjonen av tertiær amineksraktant før resirkulering av den ekstraherte kraften tilbake til fermenteringsreaksjonen.

US patent nr. 4,769,329 (Cooper et al.) beskriver en fremgangsmåte for fremstillingen av optisk ren D- eller L-melkesyre ved fermentering som anvender *Lactobacillus* ved en pH mellom 4 og 6. Imidlertid beskriver ikke Cooper et al. høyt utbytte ved en lav pH.

JP 87 44 188 beskriver fremstilling av optisk aktiv melkesyre ved en pH mellom 4.5 og 7, 0 og konsentrasjon på 101 g/l.

JP 62044188 beskriver fremstilling av optisk aktiv melkesyre med høyt utbytte av L-formen ved pH 4.5 eller høyere.

JP 92 271 787 beskriver en fremgangsmåte for fremstilling av D-melkesyre ved kultivering av I-produserende *Pseudomonas* ved en pH på 8.0 i et medium inneholdende 1,2-propandiol. Etter at fermenteringen er ferdig surgjøres kulturen med svovelsyre til en pH på 2.0 for å oppnå 21 g/l D-melkesyre.

EP 0 308 064 beskriver en forbedret tomatdrikk fremstilt ved fermentering av tomatdrikken med *Lactobacillus*. Det angis ingen steder i EP 0 308 064 noe om utbyttet eller optisk renhet av melkesyren oppnådd i en slik fermentering.

GB 2 251 864 beskriver en lavtemperatur stabil *Lactobacillus* syretolerant stamme oppnådd ved dyrking av en blandet populasjon av *Lactobacillus* i et medium inneholdende melk ved en pH fra 3.4 til 4.2. Det beskrives ingen steder i GB 2 251 864 noe om utbyttet eller optisk renhet av melkesyren oppnådd fra det lavtemperatur stabile *Lactobacillus*.

DE 27 00 644 (samme som GB 1 547 063) beskriver fermentering av plante- og/eller dyremateriale ved anvendelse av melkesyredannende, syre-tolerant *Streptococcus faecalis* bakterier eller *Leuconostoc* bakterier i et medium med en pH mellom 4 og 4.7 for å danne forstoffer for gårdsdyr og husdyr og fjærfe. Utbyttet av melkesyre ved den spesifiserte pH er ikke beskrevet.

Alle av disse måtene å produsere melkesyre i dens frie syreform basert på fermentering av *Lactobacillus* har en eller flere ulemper. Alternative måter basert på fermenteringene av andre mere syretolerante mikroorganismer har også blitt rapportert. Gjær, slik som *Saccharomyces cerevisiae*, er i stand til vekst ved mye

lavere pH enn *Lactobacillus*. Rekombinante gjærstammer har blitt produsert ved innføring av laktatdehydrogenasegenet fra en bakterie (*Lactobacillus*) eller pattedyr (bovin) kilde inn i *Saccharomyces cerevisiae*. De rekombinante gjærstammene er rapportert å være i stand til å produsere laktat ved eller under pK_a til melkesyre (ca. 3.8). Etanol er imidlertid hovedfermenteringsproduktet som genereres av disse rekombinante gjærstammene. Dette både senker effektiviteten av laktatproduksjon og introduserer ytterligere potensielle emner med hensyn på separasjonen og rensingen av fri melkesyre. Melkesyreproduksjon av en pelletform av soppen, *Rhizopus oryzae*, har også blitt rapportert. Denne soppfermenteringen produserer også typisk glyserol og/eller etanol som hovedbiprodukter. Utbytte av fri melkesyre ble optimalisert i dette tilfellet ved kontinuerlig fjerning fra fermenteringskraften ved anvendelse av en polyvinylpyridin («PVP») kolonne. Ingen laktat-konsentrasjoner høyere enn 25 g/l ble rapportert til å ha blitt generert ved lav fermenterings-pH ved anvendelse av *Rhizopus*/PVP-metoden.

Den foreliggende oppfinnelsen angår fremstillingen av laktat via fermentering. Den angår spesielt fermentering med syre-tolerante laktat-produserende mikroorganismer, slik som syre-tolerante bakterier, for å produsere en fermenteringskraft med høye nivåer av fri melkesyre. Nærværet av det høye nivået av fri melkesyre kan lette nedstrøms-behandlingen som er nødvendig for å isolere laktat i dets frie syreform fra kraften.

Nærmere bestemt angår den foreliggende oppfinnelsen en fremgangsmåte for fremstilling av melkesyre, som er kjennetegnet ved:

(a) inkubering av en syretolerant homolaktisk bakteriestamme i næringsstoffmedium ved en inkuberings-pH tilstrekkelig til å tillate fremstilling av melkesyre av den syretolerante homolaktiske bakteriestammen i næringsstoffmediumet, hvor sluttinkubasjons-pH er pH 4,0 eller mindre, og inkuberingstrinnet er tilveiebragt ved en temperatur på minst 30°C for å fremstille:

(i) en oppløsning omfattende minst 25 g/l fri L-melkesyre eller minst 25 g/l fri D-melkesyre;

(ii) fri melkesyre ved en totalhastighet på minst 1,0 g/l/h; og

(iii) oppløsningen omfatter minst 25 g/l fri L-melkesyre eller minst 25 g/l fri D-melkesyre, hvor den fri L-melkesyre er tilveiebragt ved en optisk renhet på minst 50 % eller den fri D-melkesyren er tilveiebragt ved en optisk renhet på minst 50 %; og

(b) utvinning av fri melkesyre.

Generelt er det blitt fastslått at med prosesser som utføres for å få fermenteringskrafter (eller andre melkesyrer/laktatsalt blandinger) ved pH'er på 4.8 eller lavere (fortrinnsvis 4.5 eller lavere, mest foretrukket 4.3 eller lavere, typisk 3.5 til 4.2), kan en total effektiv prosess utvikles, hvor den genererte melkesyren kan anvendes i polymerproduksjon og, om ønskelig, utvunnet laktatsalt kan resirkuleres i

fermenteringssystemet som et buffermiddel, eller på annen måte tilsatt for pH-kontroll.

5 Fremgangsmåten som tilveiebringes her for å produsere melkesyre omfatter inkubering av syre-tolerante laktat-produserende mikroorganismer, slik som syre-
 10 tolerant homolaktisk *Lactobacillus*, i næringsstoffmedium ved en pH som gir en vesentlig andel av laktatproduktet i den frie syreformen. Når uttrykket «syre-tolerant» anvendes her under referanse til bakterier, er intensjonen å referere til bakterier som er i stand til å produsere laktat ved en pH tilstrekkelig til å gi en
 15 betydelig andel av laktatproduktet i den frie syreformen. De syre-tolerante bakteriene er typisk i stand til å produsere minst 25 g/l fri melkesyre. Slike bakterier kan generelt også produsere minst 50 g/l laktat (dvs. 50 g/l total laktat) i næringsstoffmedium ved en «gjennomsnittlig inkuberings-pH» på ikke mer enn 4.2.

15 Hvis fermentering ikke utføres til et punkt hvor den begrensende laktat-konsentrasjonen nås, bestemmes «den gjennomsnittlige inkuberings-pH» basert på et gjennomsnitt av pH-verdiene målt ved 10 eller flere like tidsintervall over fermenteringens forløp. Fermenteringsprosessen kan kjøres i en kontinuerlig måte. Under slike betingelser oppnås generelt stasjonære tilstandsbetingelser (uttrykt ved pH, laktatkonsentrasjon og næringsstoffkonsentrasjoner) og opprettholdes etter at en
 20 innledende oppstartingsfase er blitt avsluttet. Når fermentering utføres på denne måte, er den gjennomsnittlige inkuberings-pH i gjennomsnitts pH'en av kraften etter at den innledende oppstartingsfasen har blitt fullført, dvs. pH'en under oppstartingsfasen ignoreres ved å bestemme den gjennomsnittlige inkuberings-pH.

25 Hvis fermentering utføres til et punkt hvor pH og/eller melkesyrekonsentrasjonen inhiberer ytterligere laktatproduksjon, bestemmes «den gjennomsnittlige inkuberings-pH» basert på et gjennomsnitt av pH-verdiene målt ved 10 eller flere like tidsintervaller over tidsrommet som er nødvendig for å produsere 90 % av den begrensende laktatkonsentrasjonen. Som anvendt her er den «begrensende laktat-konsentrasjonen» laktatkonsentrasjoner under et gitt sett av inkuberingsbetingelser
 30 (næringsstoffmedium, temperatur, luftingsgrad) hvorved pH og/eller melkesyrekonsentrasjon generert ved fermenteringen inhiberer ytterligere laktatproduksjon. Som anvendt her betyr uttrykket «begrensende inkuberings-pH» fermenteringskraftens pH for et gitt sett av inkuberingsbetingelser hvorved pH og/eller melkesyrekonsentrasjonen inhiberer ytterligere laktatproduksjon. Inhibering av
 35 laktatproduksjon anses å ha skjedd når mengden av laktat produsert ikke øker med mer enn ca. 3 % ved ytterligere inkubering i et tidsrom på opptil ca. 12 timer under de samme betingelsene. Denne definisjonen forutsetter at tilstrekkelige næringsstoffer for laktatproduksjon fortsatt er tilgjengelig i fermenteringskraften.

40 Her er uttrykkene «næringsstoffmedium» og «fermenteringskraft» anvendt om hverandre. Disse uttrykkene referer til både (i) medier i formen opprinnelig tilveiebragt til de syre-tolerante bakteriene som en næringsstoffkilde og (ii) medier

produsert etter noen eller alle av de opprinnelige tilveiebragte næringsstoffene er blitt konsumert og fermenteringsprodukter omfattende laktat har blitt utskilt i mediene av bakteriene.

5 Fermenteringskraftens pH er etter inkubering av de syre-tolerante bakteriene for å produsere laktat typisk ikke mer enn ca. 4.2 («sluttinkuberings-pH»). Som referert til her er «sluttinkuberings-pH» fermenteringskraftens pH ved det punktet at vekst og/eller laktatproduksjon ved de syre-tolerante bakteriene stanser. Stans av vekst og/eller laktatproduksjon kan være resultatet av en endring i reaksjonstemperatur, 10 tømningen av en eller flere nødvendige næringsstoffer i fermenteringskraften, en bevisst endring i pH, eller separasjonen av fermenteringskraften fra bakteriecellene. I de tilfeller hvor fermentering stanses ved tilsetning av tilstrekkelig syre eller base til kraften for å stoppe laktatproduksjon, defineres sluttinkuberings-pH til å være pH av næringsstoffmediumet like før tilsetningen. Alternativt kan vekst og/eller laktat- 15 produksjon stoppe på grunn av akkumuleringen av en eller flere fermenteringsprodukter og/eller en endring i kraftens pH resulterende fra akkumuleringen av fermenteringsprodukter, dvs. fermenteringsreaksjonen har nådd et selvbegrensende punkt for det gitte sett av inkuberingsbetingelser. Som anført ovenfor er det ganske vanlig for bakteriefermenteringer som produserer en organisk syre slik som 20 melkesyre til å utsettes for sluttproduktinhibering.

Uttrykket «laktat» som anvendt i denne fremstillingen referer til 2-hydroksypropionat i enten dens fri syre- eller saltform (dvs. «total laktat»). Uttrykkene «melkesyre» og «fri melkesyre» er anvendt om hverandre her for å referere til syreformen, dvs. 2-hydroksypropionsyre. Saltformen av laktat er spesielt referert til 25 her som et laktatsalt, f.eks. som enten natriumsaltet av melkesyre eller natriumlaktat.

Det tilveiebringes også syre-tolerante homolaktiske bakterier. De syre-tolerante homolaktiske bakteriene er generelt i stand til å produsere minst 25 g/l fri melkesyre ved en inkuberingstemperatur på minst 40°C. En annen utførelse av de syre- 30 tolerante bakteriene er i stand til å produsere ved minst 50 g/l laktat ved en temperatur over ca. 40°C og en gjennomsnittlig inkuberings-pH på ikke mer enn ca. 4.2. Typisk er de syre-tolerante bakteriene i stand til å tilfredsstille begge disse målinger av laktatproduktivitet.

Figur 1 er en skjematisk fremstilling av et flytskjema av en fermenteringsprosess som omfatter den koblede fjerning av fri melkesyre. 35

Figur 2 er en kurve som viser ribotypemønstrene for en rekke laktat-produserende bakteriestammer isolert fra maisekstraktvann.

Figur 3 er en graf som viser fermenteringsprofilen av glukose, fruktose og laktat for inkubering av stamme nr. #41 i et næringsstoffmedium inneholdende 10 vol. % 40 maisekstraktvæske, 100 g/l glukose og 33.4 g/l kalsiumkarbonat.

Figur 4 er en kurve som viser laktatproduksjon fra inkubering av stamme nr. #41 i et næringsstoffmedium inneholdende 90 g/l glukose, 33.4 g/l kalsiumkarbonat og enten 12 vol. % maissekstraktvæske eller 36 vol. % lett ekstraktvann.

- 5 Figur 5 er en kurve som viser fermenteringsprofilen av glukose, fruktose og laktat for inkubering av homolaktisk stamme nr. #41 i et næringsstoffmedium inneholdende 90 g/l glukose, 36.6 g/l kalsiumkarbonat og varierende mengder av maissekstraktvann.

- 10 Figur 6 er en kurve som viser prosenten av udisosiert melkesyre («fri melkesyre») som en funksjon av pH.

Generering av melkesyreløsninger, via bakteriologiske systemer, som har pH på 5.0 eller lavere, fortrinnsvis 4.8 eller lavere og typisk 3.5 til 4.5, fører til en større prosent av produksjon av laktatmateriale, i melkesyreformen. Genereringen av relativt store mengder av produkt fra fermenteringsprosessen i formen av melkesyre, istedenfor laktatsalt, er fordelaktig siden det kan redusere behovet for, eller graden av, visse oppfølgende prosesstrinn for forsuring og/eller «saltsplitting». Dvs. at hvis en større mengde av materialet genereres som fri melkesyre, reduseres og unngås et prosesstrinn for generering av melkesyren fra laktatet og utgiftene og konsekvensene som er forbundet derved. Selv hvis noe forsuring utføres ville vesentlig mindre syretilsetning involveres inn tilfellet ville være med et høyt pH-system. Generelt er det blitt fastslått at med prosesser utført for å få fermenteringskraft ved pH på ca. 4.8 eller lavere (fortrinnsvis 4.5 eller lavere, mest foretrukket 4.3 eller lavere, typisk 3.5 til 4.2), kan en total effektiv prosess utvikles hvori melkesyren som genereres kan anvendes i polymerproduksjon, og utvunnet laktatsalt kan resirkuleres inn i fermenteringssystemet som et buffermiddel, eller sagt på annen måte for pH-kontroll.

Den foreliggende fremgangsmåten muliggjør den effektive produksjonen av laktat og særlig den effektive produksjonen av høye konsentrasjoner av en fri melkesyre via inkubering av en syre-tolerant homolaktisk bakterie i et passende næringsstoffmedium. Den syre-tolerante homolaktiske bakterien kan isoleres fra maissekstraktvannet i et kommersielt maismøllelegg. Mens forskjellige bakterier av denne typen kan produsere enten racemisk laktat, eller laktat hovedsakelig i enten D- eller L-isomerformen, anvender fremgangsmåten fortrinnsvis en homolaktisk bakterie som produserer hovedsakelig L- eller D-laktat, og mest foretrukket produseres L-laktat i optisk ren form.

40 Fremgangsmåten muliggjør den effektive produksjonen av høye konsentrasjoner av fri syreform av en optisk isomer av melkesyre. Denne effektiviteten kan uttrykkes på en rekke forskjellige måter. Konsentrasjonen av fri melkesyre i fermenteringskraften virker som et mål for prosessens totale produktivitet. Fremgangsmåten generer typisk en løsning omfattende minst 25 g/l, fortrinnsvis minst 30 g/l, og mer

foretrukket minst 40 g/l fri melkesyre. Mest foretrukket produserer fremgangsmåten disse nivåer av enten fri L-melkesyre eller fri D-melkesyre. Den optiske renheten av laktatet (og fri melkesyre) som produseres er fortrinnsvis minst 50 %, nærmere
 5 foretrukket minst 80 % og, mest foretrukket produseres en optisk isomer av laktat i alt vesentlig ren form.

Som anført ovenfor er typisk det produserte laktatet i fremgangsmåten hovedsakelig i form av L-laktat. For eksempel omfatter en utførelse av fremgangsmåten inkubering av en syre-tolerant homolaktisk bakterie i næringsstoffmedium for å
 10 produsere laktat som omfatter minst 75 vekt % L-laktat (dvs. L-laktat med en optisk renhet på minst 50 %). Fortrinnsvis er den optiske renheten av laktatet produsert i fremgangsmåten minst 80 %, og mer foretrukket minst 90 % (f.eks. omfatter minst 95 vekt % L-laktat). Mest foretrukket produserer fremgangsmåten L- eller D-laktat i alt vesentlig optisk ren form (dvs. laktatet som produseres inneholder 99 vekt %
 15 eller høyere av et enkelt optisk isomer).

Hvis en fermenteringskraft har en pH-verdi mellom 3.0 og 4.5, vil det være en betydelig mengde av melkesyre i den udissoierte formen (jfr. fig. 6). Optisk ren pH på 3.0 er molforholdet mellom fri melkesyre (udissosiert) og laktation ved 25°C ca. 7.0; og en pH på ca. 4.5 er forholdet ved 25°C ca. 0.23. Den totale mengden av fri
 20 melkesyre som er tilstede i en løsning er en funksjon av både pH av løsningen og den totale konsentrasjonen av laktat i blandingen. Ved således å spesifisere disse to parameterne for en gitt løsning, slik som en fermenteringskraft, spesifiseres effektivt den fri melkesyrekonsentrasjonen. Fremgangsmåten er i stand til å generere en løsning som omfatter minst 50 g/l, fortrinnsvis minst 80 g/l, og mer
 25 foretrukket minst 100 g/l laktat ved en relativt lav pH. Jo lavere løsningens pH er jo høyere er prosenten av laktatet som er tilstede i dens frie syreform. For eksempel hvor mediumets pH er lik pK_a av melkesyre (ca. 3.8), er 50 % av laktatet tilstede i den fri syreformen. Ved pH 4.2 er ca. 31 % av laktatet som en fri syre og ved pH 4.0 og 3.9 er henholdsvis ca. 41 % og 47 % av laktatet til stede i den fri syreformen.
 30 Fraksjonen av fri melkesyre er enda lavere ved høyere pH, 18 % ved pH 4.5 og 6.6 % ved pH 5.0.

pH av kraften under inkuberingstrinnet kan uttrykkes på flere forskjellige måter, f.eks. uttrykt ved den gjennomsnittlige inkuberings-pH eller sluttinkuberings-pH. Fermenteringsprosessen er typisk i stand til å produsere høye nivåer av laktat ved en
 35 gjennomsnittlig inkuberings-pH på ikke mer enn ca. 4.3, fortrinnsvis ikke mer enn ca. 4.2, og mer foretrukket ikke mer enn ca. 4.0. Alternativt kan pH av kraften under inkubering uttrykkes ved sluttinkuberings-pH. Fremgangsmåten muliggjør typisk produksjonen av høye laktatkonsentrasjoner ved en sluttinkuberings-pH på ikke mer enn ca. 4.2, fortrinnsvis ikke mer enn ca. 4.0, og mer foretrukket ikke mer
 40 enn ca. 3.9. Særlig effektive utførelse av fermenteringsprosessen er i stand til å

produsere minst 80 g/l laktat ved en gjennomsnittlig inkuberings-pH på ikke mer enn ca. 4.0 og/eller en sluttinkuberings-pH på ikke mer enn ca. 3.9.

5 Fermenteringsprosessen kan kjøres ved en kontinuerlig måte hvor en fraksjon av fermenteringskraften fjernes ettersom fermenteringen forløper. Dette kan gjøres enten kontinuerlig eller ved periodiske intervaller. Tilstrekkelige næringsstoffmedium tilsettes typisk reaktoren for å opprettholde et konstant væskevolum. Under slike fermenteringsbetingelser oppnås stasjonære tilstands-
10 betingelser (uttrykt ved pH, laktatkonsentrasjon og næringsstoffkonsentrasjoner) generelt og opprettholdes etter en innledende oppstartingsfase er blitt avsluttet. Når fermentering utføres på denne måte er den gjennomsnittlige inkuberings-pH (pH under oppstartingsfasen ignoreres) og sluttinkuberings-pH av kraften i alt vesentlig den samme. Under slike betingelser utføres fermentering typisk ved en pH på ikke mer enn ca. 4.2, fortrinnsvis ikke mer enn ca. 4.0, og mer foretrukket ikke mer enn
15 ca. 3.9.

Skjønt inkuberingsprosessen kan utføres ved relativt lave temperaturer, f.eks. 30°C til 38°C, inkuberes de syre-tolerante homolaktiske bakteriene typisk i et egnet næringsstoffmedium ved en temperatur på minst 43°C, og mer foretrukket ved 45°C til 52°C. Mest foretrukket utføres fermenteringen ved 47°C til 50°C. Det er en rekke
20 fordeler med å operere fermenteringen ved disse temperaturene. Sjansene for komplikasjoner på grunn av vekst av andre konkurrerende organismer reduseres i dette temperaturområdet. I tillegg vil ved høyere temperaturer reaksjonen generelt forløpe ved en raskere hastighet som muliggjør effektiv benyttelse av et prosessutstyr. Hvis fermentering utføres ved en for høy temperatur, typisk ved ca.
25 54°C eller høyere, kan vekst og/eller laktatproduksjon av de homolaktiske bakteriene være neglisjerbar. Det kan imidlertid være mulig ved anvendelse av standard seleksjonsteknikker å identifisere mutante homolaktiske bakteriestammer som er i stand til vekst og laktatproduksjon ved temperaturer på 55°C og høyere.

Som beskrevet her refererer «næringsstoffmedium» til en vannbasert blanding
30 omfattende mineraler og deres salter som er nødvendig for vekst av bakterien i den foreliggende oppfinnelsen. Næringsstoffmediumet inneholder typisk effektive mengder av en karbonkilde, en nitrogenkilde, en fosfatkilde, en sulfatkilde, kalsium og sporelementer. Uttrykket «sporstoffelementer» referer til elementer i alt vesentlig for vekst i sporkonsentrasjoner, dvs. svært lave fraksjoner på 1 prosent
35 (1000 ppm eller mindre).

Bakterier ifølge den foreliggende oppfinnelse kan typisk benytte en rekke karbon- og energikilder for vekst og/eller laktatproduksjon, slik som glukose, fruktose, galaktose, melbiose, sukrose, raffinose og/eller stachyose. Noen av bakteriene kan også være i stand til å anvende alle eller de fleste av disse sukkerene som en
40 karbonkilde og energikilde mens andre stammer er mer kresne og kan bare være i

stand til å vokse på en av to sukre fra listen. I andre tilfeller kan en stivelse (slik som maisstivelse) eller et hydrolysat derav anvendes som primær karbohydratkilde.

Som anvendt her referer «maisekstraktvann» til vann oppnådd fra maisekstrakt-
5 tanker samt andre oppløsninger avledet derfra som har alt vesentlig det samme spektrum av næringsstoffer. For eksempel er maisekstraktvæske (også noen ganger referert til som «tungekstraktvann») i en konsentrert form av maisekstraktvann oppnådd ved fjerning av vann og andre flyktige komponenter, typisk under vakuum. Maisekstraktvæske har typisk et tørrstoffinnhold på 35 vekt % til 50 vekt %.
10 Maisekstraktvæsken som anvendes i forsøkene beskrevet i eksemplene i denne fremstillingen hadde et tørrstoffinnhold på 36 vekt % og er referert til her som «CSL». Maisekstraktvannene som oppnås direkte fra maisekstrakttankene og/eller de forbundne linjene like før konsentrering for å produsere maisekstraktvæske har generelt tørrstoffinnhold i området på 10 vekt % til 15 vekt % og er referert til her
15 som «lett ekstraktvann» («LSW»). Lett ekstraktvann har typisk et SO₂-innhold på ikke mer enn ca. 500 ppm. Ekstraktvannet som anvendes for å supplementere næringsstoffmediumet anvendt i fremgangsmåten har fortrinnsvis et SO₂-innhold på ikke mer enn ca. 300 ppm og, mer foretrukket ikke mer enn ca. 200 ppm. Det lette ekstraktvannet som anvendes i forsøkene beskrevet i eksemplene i denne
20 fremstillingen hadde et tørrstoffinnhold på 12 vekt %.

I situasjoner hvor en eller flere homolaktiske stammer isolert fra maisekstraktvann skal anvendes for å produsere laktat, omfatter næringsstoffmediumet typisk maisekstraktvann tilsvarende minst 15 g/l ekstraktvann-tørrstoff. Fortrinnsvis
25 omfatter næringsstoffmediumet maisekstraktvann tilsvarende minst 25 g/l, og mer foretrukket minst 30 g/l ekstraktvann-tørrstoff.

Et eksempel på egnet næringsstoffmedium for anvendelse i fermenteringsprosessen er MRS-medium (slik som MRS-mediumet kommersielt tilgjengelig fra Becton Dickinson & Co.) eller lignende. MRS-mediumet supplementerer generelt med maisekstraktvann for å tilveiebringe en nitrogenkilde og generell kilde for
30 næringsstoffer samt med ytterligere karbohydrat (slik som glukose eller fruktose) som en karbon- og energikilde. Typiske medier som egner seg til bruk i fremgangsmåten omfatter også magnesiumsalt(er), mangansalt(er), fosfatsalt(e), kaliumsalt(er) og/eller citratsalt(er). Det kan imidlertid ikke være nødvendig å tilsette spesifikke mengder av slike salter til mediumet. Ofte omfatter
35 næringsstoffmediumet også et ikke-ionisk overflateaktivt stoff, slik som fettsyremonoester av et polyoksyetylenderivat av sorbitan (f.eks. Tween^R 80 som er polyoksyetylen (20) sorbitanmonooleat).

Mediumet kan fremstilles ved anvendelse av separate salter som kilder for hver av de forskjellige uorganiske komponentene. Alternativt kan et enkeltsalt som virker
40 som en kilde på ikke mer enn en komponent anvendes for å fremstille næringsstoffmediumet. For eksempel kan kaliumhydrogenfosfat (K₂HPO₄) tilsettes som en kilde

for både kaliumkationer og fosfatanioner. Det vil erkjennes at etter at de forskjellige komponentene har blitt oppløst i vann under fremstillingen av næringsstoffmediumet, vil det skje en utbytting av kationer og anioner blant de forskjellige oppløste saltene som er tilstede. For eksempel hvis magnesiumsulfat og ammoniumcitrat tilsettes vann under fremstillingen av mediumet, vil den resulterende løsningen også omfatte noen ammoniumsulfat- og magnesiumcitratspesier i tillegg til magnesiumsulfat- og ammoniumcitratspesier. En type av næringsstoffmedium som er spesielt egnet for anvendelse i fermenteringsprosessen omfatter maisekstraktvann supplementert med glukose og/eller fruktose som en ytterligere karbon- og energikilde.

Et eksempel på et egnet medium for anvendelse i den foreliggende oppfinnelse omfatter:

maisekstraktvann tilsvarende 30 til 45 g/l ekstraktvann-tørstoff;
 80 til 120 g/l glukose, fruktose eller en blanding derav;
 0 til 10 g/l gjærekstrakt;
 0 til 1 g/l av ikke-ionisk overflateaktivt stoff slik som Tween^R 80;
 0 til 2 g/l kaliumhydrogenfosfat (K₂HOP₄);
 0 til 0.2 g/l magnesiumsulfat (MgSO₄);
 0 til 0.05 g/l mangansulfat (MnSO₄);
 0 til 2 g/l ammoniumsitrat; og
 eventuelt 10 til 50 g/l kalsiumkarbonat (CaCO₃).

Av grunner diskutert ovenfor refererer mengdene til kvantiteter av de tilsatte forskjellige materialene for å danne mediumet og ikke til de virkelige konsentrasjonene av disse spesiene i næringsstoffmediumet. Ved å lage et slikt næringsstoffmedium oppløses alt av komponentene unntatt det ikke-ioniske overflateaktive stoffet og kalsiumkarbonatet generelt i en passende mengde vann og autoklave steriliseres. Det ikke-ioniske overflateaktive stoffet tilsettes typisk til det autoklavede mediumet mens det fremdeles er ved en temperatur på nær opptil 100°C. Den resulterende løsningen lar man så typisk kjøle til ca. 60°C eller lavere før kalsiumkarbonatet tilsettes.

Det har blitt funnet at egnede næringsstoffmedier for anvendelse i fremgangsmåten fortrinnsvis omfatter minst 50 g/l karbohydrat. Mere foretrukket omfatter næringsstoffmediumet minst 70 g/l og mest foretrukket minst 90 g/l av karbohydratet. Karbohydratet utgjøres typisk av glukose, fruktose, galaktose, melibiose, sukrose, raffinose, stachyose eller en blanding derav. Glukose, fruktose og sukrose er spesielt egnet for anvendelse som en karbon- og energikilde i næringsstoffmediumet. Det er generelt ikke nyttig å innarbeide mer enn ca. 150 g/l karbohydrat i mediumet.

Det er blitt funnet at det kan være fordelaktig å omfatte en base slik som kalsiumkarbonat (CaCO₃), natriumhydroksid (NaOH), ammoniumhydroksid

(NH₄OH) og/eller natriumbikarbonat (NaHCO₃). Typisk tilsettes minst 30 g/l kalsiumkarbonat (eller en ekvivalent mengde av en annen base) til næringsstoffmediumet. I noen utførelser av fremgangsmåten, f.eks. utførelse som produserer høyere nivåer av laktat, kan det være foretrukket å omfatte opptil 40 g/l kalsiumkarbonat i næringsstoffmediumet. Mens høyere nivåer av base kan anvendes, på grunn av begrensninger på løseligheten av kalsiumkarbonatsalter og ønske om å opprettholde en relativt lav kraft-pH, er det generelt ikke nyttig å innarbeide mer enn ca. 100 g/l kalsiumkarbonat i mediumet. Svært ofte vil hele mengden av kalsiumkarbonat tilstede ikke innledningsvis oppløses i næringsstoffmediumet. Ettersom fermenteringen forløper kan noe av kalsiumkarbonatet reagere med melkesyren som dannes for å generere kalsiumlaktat. Da dette skjer kan ytterligere porsjoner av det uoppløste kalsiumkarbonatet bli trukket inn i løsningen. Den totale effekten er å nøytralisere en porsjon av den dannede melkesyren og forhindre kraftens pH i å falle under et ønsket nivå (f.eks. under 3.8-3.9).

Det bør ikke være nødvendig å tilsette en base slik som kalsiumkarbonat for å oppnå denne effekten. En løsning inneholdende et laktatsalt (f.eks. kalsium-, natrium- eller ammoniumlaktat) kan tilsettes som et bidrag til buffring av fermenteringskraftens pH. Et eksempel på en fremgangsmåte hvor dette kan skje vil omfatte separasjonen av en fraksjon av fermenteringskraften fra de inkuberte bakteriene, og resirkulering av porsjonen tilbake inn i fermenteringen etter fjerning av noe eller alt av den fri melkesyren i fraksjonen. Alternativt kan kalsiumlaktat isoleres fra fermenteringskraften (f.eks. i fast form), og blandes sammen med et næringsstoffmedium som tilsettes fermenteringen. Generelt kan tilsetning av laktatsalt som et buffersalt være fordelaktig fordi det minimaliserer mengden av nøytraliseringsbase tilsatt fermenteringskraften for derved å minimalisere mengden av laktat produsert som omdannes til saltform.

Næringsstoffmedier omfatter minst 70 g/l glukose og/eller fruktose og minst 20 g/l kalsiumkarbonat er særlig egnet til bruk i fremgangsmåten. Avhengig av bakteriestammen som anvendes i fremgangsmåten, kan innarbeidelse av maisekstraktvann (f.eks. i en mengde ekvivalent til minst 25 g/l maisekstraktvann-tørstoff) i dette næringsstoffmediumet også være foretrukket. Det er særlig nyttig å tilsette maisekstraktvann inneholdende bare den samme chirale formen av laktat som skal genereres ved fermenteringsprosessen.

Stammen av homolaktiske bakterier og fermenteringsbetingelsene er typisk valgt slik at fri melkesyre produseres ved en total hastighet på minst 0.5 g/l/h, fortrinnsvis minst 1.0 g/l/h, mer foretrukket minst 2.0 g/l/h, og mest foretrukket minst 4.0 g/l/h. Som anvendt her beregnes total produksjonshastighet av enten laktat eller fri melkesyre (eller laktat) ved å dividere den totale mengden av fri melkesyre (laktat) produsert ved inkuberingstiden. For fermenteringer hvor begrenset

laktatkonsentrasjon produseres, beregnes den totale produksjonshastigheten av fri melkesyre (laktat) over tiden som er nødvendig for å produsere 90 % av det begrensede fri melkesyre (laktat) konsentrasjonen.

- 5 Produktiviteten av fremgangsmåten kan også uttrykkes ved den totale produksjonshastigheten for laktat. Fermenteringsprosessen utføres generelt under betingelse som produserer laktat ved en total hastighet på minst 1.0 g/l/h, fortrinnsvis minst 2.0 g/l/h og mer foretrukket ved minst 3.0 g/l/h. Som anført her produseres laktat fortrinnsvis ved disse hastigheter i en kraft ved en gjennomsnittlig
10 inkuberings-pH på ikke mer enn ca. 4.1, mer foretrukket ikke mer enn ca. 4.0.

Egnede eksempler på homolaktiske bakterier for anvendelse i den foreliggende fermenteringsmetoden kan lett isoleres fra prøver av maissekstraktvann, slik som det er funnet i kommersielle maismøllelegg. I tillegg kan visse andre homolaktiske bakterier isolert fra forskjellige kilder også ha de nødvendige kapabiliteter til å
15 tillate effektiv lav pH-produksjon av høye nivåer av fri melkesyre.

Siden de homolaktiske bakteriene funnet i maissekstraktvann typisk krever et næringsstoffmedium som omfatter maissekstraktvann for vekst, omfatter innledningstrinnet i en prosess for identifisering og isolering av en slik bakterie typisk plateprøver i et ekstraktvann-inneholdende medium, slik som 10 vol. % CSL-MRS-agar, og deretter inkubering av det inokulerte mediumet anaerobt ved 45-
20 50°C. Bakterielle isolater kan lett undersøkes for heterolaktisk produksjon ved å føre isolatet inn i et bifasemedium som bare inneholder ekstraktvann i den nedre fasen. De voksende stammene styres så for genereringen av gass ved bunnen av bifaserørene. De isolerte stammene kan på passende måte lagres ved lav temperatur
25 (f.eks. 4°C eller lavere) eller opprettholdes som en «bench stock» i et ekstraktvann/tomatjuice/MRS-agar vekstmedium. Om ønskelig kan en eller flere syre-tolerante stammer isolert på denne måte fra maissekstraktvann anvendes som et innpodingsmiddel i en melkesyrefermentering.

Ved anvendelse av denne type metodikk ble ekstraktvannprøver oppnådd fra fem
30 forskjellig maismøllelegg i USA og også tre maismøllelegg i Tyrkia, England og Nederland undersøkt for laktatproduserende mikroorganismer. De isolerte mikroorganismene ble innledningsvis karakterisert som heterolaktiske (dvs. i stand til å produsere andre fermenteringsprodukter i tillegg til laktat) eller homolaktiske produsere. De homolaktiske stammene ble ytterligere karakterisert blant annet
35 basert på total laktatproduksjon, optisk aktivitet av laktat produsert og i mange tilfeller sluttinkuberings-pH i fraværet av base (CaCO₃) tilsatt fermenteringsmediumet. Et total på 155 bakteriestammer ble isolert. Av de 109 stammene som ble karakterisert produserte 98 stammer (90 %) laktat som det eneste fermenteringsproduktet («homolaktiske» stammer). Som anvendt her referer uttrykket
40 «homolaktisk» til en bakteriestamme som produserer i alt vesentlig bare melkesyre som fermenteringsproduktet. De resterende 11 stammene (11 %) produserte andre

fermenteringsprodukter i tillegg til laktat («heterolaktiske» stammer). Av de 98 homolaktiske stammene var 22 L-laktatproduserere, 18 var D-laktatproduserere og 58 produserte racemisk laktat.

- 5 Den foreliggende homolaktiske bakterien er generelt i stand til å produsere ved minst 25 g/l fri melkesyre. Mest foretrukket er bakterien homolaktisk bakterie i stand til å produsere minst 30 g/l fri L-melkesyre. I en annen utførelse av oppfinnelsen er den homolaktiske bakterien i stand til å generere en løsning inneholdende minst 40 g/l, fortrinnsvis minst 75 g/l laktat, og fortrinnsvis minst 90
- 10 g/l laktat ved en gjennomsnittlig inkuberings-pH på ikke mer enn ca. 4.3. Som anført ellers her er særlig effektive stammer av den foreliggende homolaktiske bakterien i stand til å produsere disse nivåer av L-laktat (eller D-laktat) ved en gjennomsnittlig inkuberings-pH på ikke mer enn ca. 4.0 og/eller en sluttinkuberings-pH på ikke mer enn ca. 3.9.
- 15 Den foreliggende syre-tolerante homolaktiske bakterien er typisk i stand til vekst og melkesyreproduksjon ved temperaturer mellom 35°C og 53°C. Optimal temperatur for vekst er generelt i området fra 43°C til 52°C og fortrinnsvis 47°C til 50°C, skjønt det er blitt demonstrert at den homolaktiske bakterien kan vokse ved temperaturer ved eller nær romtemperatur. Neglisjerbar laktatproduksjon av
- 20 bakterien skjer typisk når temperaturen er over ca. 53°C eller under ca. 30°C. Fermenteringsprosessen utføres fortrinnsvis ved 47°C til 52°C, siden gjær og heterolaktisk lactobacilli er mindre varmetolerant og vil generelt ikke vokse godt, hvis noe i det hele tatt, ved disse temperaturene. Således kan i tillegg til å øke laktatproduksjon fermentering av den syre-tolerante homolaktiske bakterien ved høy
- 25 temperatur senke mulige problemer som er forbundet med forurensning av andre organismer.
- De foreliggende homolaktiske bakteriene er typisk i stand til vekst og laktatproduksjon minst innenfor et pH-område på 3.7 til 6.5 og fortrinnsvis minst over et pH-område fra 3.8 til 5.0. Selv om bakteriene kan være i stand til å produsere laktat
- 30 ved en pH nær nøytral (f.eks. 6.0-6.5), er bakterien anvendt i den foreliggende oppfinnelsen fortrinnsvis i stand til høye nivåer av laktat ved en pH hvor en betydelig andel av laktatet eksisterer i dens frie syreform. Foretrukne former av den syre-tolerante homolaktiske bakterien er i stand til signifikant laktatproduksjon (f.eks. minst 50 g/l) ved en pH på 4.2 eller lavere.
- 35 En rekke reaktorkonfigurasjoner omfattende pakkede sjiktreaktorer, kontinuerlig rørte tankreaktorer, roterende biologiske kontaktreaktorer, sekvenserende satsreaktorer og fluidiserte sjiktreaktorer kan anvendes i fremgangsmåten. Hele reaksjonen kan utføres i et enkelt kar som har egnede midler/organer for å kontrollere temperaturen av fermenteringskraften eller alternativt fermentering kan
- 40 utføres i et første kar, kraften kan administreres ved den ønskede temperaturen ved passasje gjennom en varmeveksler, f.eks. en platevarmeveksler og resirkuleres til

fermenteringsreaksjonen. Det sistnevnte arrangementet kan gi raskere kjøling av reaksjonsblandingen og kan i noen tilfeller utføres samtidig som kraft passerer gjennom en membranseparasjonsmodul for å fjerne en andel av kraften (f.eks. hvor varmeveksleren og membranmodulen er forbundet i serie).

En vanlig anvendt konfigurasjon omfatter en membranresirkuleringsbioreaktor. Reaktorer av denne typen omfatter typisk to moduler, et fermenteringskar 10 og en membranmodul 15 (jfr. f.eks. figur 1). Disse to modulene kan være forbundet ved et rør eller være deler av et enkelt apparat.

I en utførelse av oppfinnelsen kan syre-tolerante homolaktiske bakterier inkuberes i en første andel av næringsstoffmedium i fermenteringskaret for å generere en første produktløsning omfattende minst 25 g/l fri L-melkesyre. Den resulterende fermenteringskraften kan separeres for å gi en første fraksjon som omfatter fri melkesyre og er vesentlig fri for bakterieceller. Dette kan utføres ved å pumpe en andel av fermenteringen gjennom en celleseparator (f.eks. en hul fibercelleseparator). Den celle-innholdende fraksjonen resirkuleres typisk tilbake til fermenteringskaret (jfr. f.eks. figur 1), mens den melkesyre-inneholdende fraksjonen splittes for ytterligere bearbeiding. Ytterligere næringsstoffmedium tilsettes typisk for å opprettholde væskevolumet i fermenteringskaret ved et konstant nivå. Når fermentering utføres på denne måten, oppnås stasjonære tilstandsbetingelser (uttrykt ved pH, laktatkonsentrasjon og næringsstoffkonsentrasjoner) generelt og opprettholdes etter en innledende oppstartingsfase har blitt avsluttet. Når dette er blitt kjørt på denne måten utføres den foreliggende fermenteringen typisk slik at kraftens pH opprettholdes ved ca. 4.2 eller lavere, og fortrinnsvis i området mellom 3.7 og 4.0.

Den melkesyre-inneholdende fraksjonen som splittes kan bearbeides ved anvendelse av en rekke kjente metoder for å separere fri melkesyre fra de andre komponentene i løsningen. For eksempel kan melkesyren ekstraheres fra løsningen ved anvendelse av et tertiært amin-inneholdende ektstraktant. Et eksempel på en egnet ekstraktant er en løsning av Alamine 336 i oktylalkohol. Andre metoder som kan anvendes for å isolere melkesyren omfatter det å bringe løsningen i kontakt med en fast adsorbent, slik som en ioneutbytteharpiks (f.eks. en polyvinylpyridinkolonne), destillere bort en melkesyre-inneholdende fraksjon, eller fjerning via membranseparasjon. Enhver av disse typer separasjonsmetoder kan anvendes for å bearbeide den melkesyre-inneholdende fraksjonen for å generere en melkesyre-uttynnet fraksjon og en laktatisolatfraksjon. Den melkesyre-uttynnede fraksjonen kan inneholde noe laktat i formen av et laktatsalt, slik som kalsiumlaktat. Laktatisolatfraksjonen kan videre bearbeides ved anvendelse av hvilken som helst av de kjente metoder for å produsere en renere form av fri melkesyre.

Den melkesyre-inneholdende fraksjonen kan også bearbeides for å separere ut laktatsalt (f.eks. kalsiumlaktat) i fast eller løsningsform, som etterlater en løsning

anrikt med hensyn på fri melkesyre. Laktatsaltet kan separeres ved anvendelse av en egnet teknikk slik som ekstraksjon, krystallisasjon, membranseparasjon og adsorpsjon på et fast materiale (f.eks. anionutbytteharpiks). Laktatsaltet kan
 5 returneres til fermenteringskaret hvor den kan være med å buffre løsningens pH og forhindre kraftens pH i å falle under et ønsket nivå. F.eks. ved resirkulering av en tilstrekkelig mengde av kalsiumlaktat som et buffermiddel, kan fermenteringskraftens pH opprettholdes ved en verdi nær pK_a av melkesyre. Basert på teori vil laktatsaltet buffre produksjon av en ekvivalent mengde av ny melkesyreproduksjon
 10 ved en pH på 3.85. Ved pH 4.0 vil hver ekvivalent av laktatsalt buffre produksjon på 0.7 ekvivalentmengde av ny melkesyreproduksjon.

En rekke metoder er tilgjengelig for bearbeiding av laktat/melkesyreløsninger omfattende det å generere store mengder av melkesyre f.eks. i løsning ved pH som ikke er høyere enn ca. 4.8 (fortrinnsvis ikke høyere enn 4.2 eller 4.3) fra fermenteringskraften; og, med en ledsagende isolasjon (og om ønskelig resirkulering) av
 15 laktatsalt (typisk kalsiumlaktat, kaliumlaktat, natriumlaktat og/eller ammoniumlaktat). Slike prosesser er beskrevet f.eks. i US patentsøknad (til Cargill, Inc., Minnetonka, Minnesota, USA) med tittelen Lactid Acid Processing; Methods; Arrangements; and Products, hvor John N. Starr, Aharon M. Byal, Riki Canari, Betty Hazan og Rod Fisher er oppfinnere (heretter referert til som The Starr et al. søknaden). The Starr et al. søknaden ble innlevert på samme dato som den foreliggende søknaden (14. oktober 1997). Fordelaktige totalprosesser vil avhengig delvis av valg blant annet av metodene av de som lettest begunstiger en total kostnadseffektiv og effektiv bearbeidingsrute i storskala-implementering.

25 Prinsippet angår det å velge totalprosesser som angår utformingen av systemet for å tilpasse de to formålene med:

1. Isolasjon av melkesyreprodukter for oppfølgingsbearbeiding, f.eks. for å generere polymer; og
2. Isolasjon av laktatsalt, fortrinnsvis i en form som er ønskelig for
 30 resirkulering til fermenteringskraften.

Tre generelle metoder angår:

1. Separasjon av melkesyren fra løsningen som etterlater laktatsaltet; og om ønskelig føring av restløsningen som har laktatsaltet deri, etter separeringen, til en fermentor;
- 35 2. Isolasjon av laktatsaltet fra løsningen; føring av laktatsaltet, om ønskelig, i en fermentor; og en oppfølgingsisolering av melkesyreproduktet fra restløsningen etter laktatsaltseparasjon; og
3. Samtidig separasjon av melkesyre i en strøm og laktatsalt i en annen, som etterlater restblanding.

Teknikkene beskrevet i Starr et al. for å oppnå en eller begge av disse formålene kan praktiseres på en rekke løsninger av laktatmaterialet (dvs. løsninger av melkesyre og oppløst laktatsalt). Disse løsningene kan omfatter fermenteringskraft eller kraft som har blitt fjernet fra en fermentor og modifisert på samme måte, f.eks. ved filtrering eller pH-regulering. Faktisk kan teknikkene anvendes også for løsningene som er laget på andre måter.

Teknikkene og forslagene beskrevet der er imidlertid spesielt utviklet med et fokus på effektiv bearbeiding av fermenteringskraftløsninger, spesielt relativt de som er sure, hvor pH-modifisering ved tilsetning av syre ikke er nødvendig og fortrinnsvis ikke har skjedd. Typiske blandinger hvor disse teknikkene kan anvendes, med hensyn på pH, vil være minst 0.86 og mindre enn 6.0. Dvs. at typiske blandinger som disse teknikkene vil kunne utøves på, vil ha en pH innen dette området. For slike blandinger er molforholdet mellom fri melkesyre og dissosiert syre eller oppløst laktatsalt ved 25°C innenfor et område av 1.000:1 til 0.007:1. Mer foretrukket bearbeiding vil omfatte løsninger med en pH på 1.98-5.00 (HLA:LA forhold innenfor det området på 75:1 til 0.070:1); og mest foretrukket vil bearbeiding omfatte løsninger som har en pH innenfor området på 3.0-4.5 (HLA:LA forhold innenfor området av 7.0:1 til 0.23:1).

Som anført ovenfor oppnås løsninger innenfor det mest foretrukne pH-området beskrevet ovenfor lett via fermenteringsprosessen med betydelige konsentrasjoner av laktatmateriale deri. Alternativt kan andre fermenteringskrefter anvendes, f.eks. med pH-regulering ved tilsetning av syre typisk til det mest foretrukne gitte pH-området.

Det vil her noen ganger refereres til »foretrukket separering» av: melkesyre fra en blanding inneholdende melkesyre og laktatsalt; eller laktatsalt fra blanding inneholdende melkesyre og laktatsalt. Uttrykket «foretrukket separering» og varianter derav er i denne sammenheng ment å referere til separasjonsteknikk som fortrinnsvis fjerner en av de to komponentene (melkesyre eller laktatsalt) med hensyn til den andre. I typisk foretrukket bearbeiding i følge den foreliggende oppfinnelsen er en blanding av melkesyre og laktatsalt oppdelt i to «produktstrømmer». I en produktstrøm (dvs. den fri melkesyrerike strømmen), er fortrinnsvis molforholdet mellom fri melkesyre og laktatsalt minst 2/1 og fortrinnsvis minst 3/1. Med noen av teknikkene omtalt her er forhold på minst 5/1 og faktisk forhold på 10/1 eller mer lett å oppnå.

Den andre produktstrømmen er den laktatsaltrike strømmen. I denne strømmen er fortrinnsvis molforholdet mellom fri melkesyre og laktatsalt ikke større enn 0.5. Mer typisk foretrukket bearbeiding som beskrevet her er forhold på ikke større enn 0.3, fortrinnsvis ikke større enn 0.2 og mest foretrukket 0.1 eller lavere lette å oppnå.

Her er uttrykket «strøm», når anvendt i konteksten angitt i de foregående to avsnittene, ment å referere til en isolert fase eller produktsegment, uansett om fasen eller produktsegmentet er en løsning, et faststoff eller en blanding av materialer.

5 Således er en «laktatsyrerik strøm» bare en fase eller en blanding rik på melkesyre (i forhold til laktatsalt) ved sammenligning med den opprinnelige bearbeidede blandingen; og en «laktatsaltrik strøm» er en strøm rik på laktatsalt (i forhold til melkesyre) ved sammenligning med den opprinnelige bearbeidede blandingen.

10 Når produktstrømmen anriket på fri melkesyre oppnås som et resultat av å separere den fri melkesyren fra blandingen, f.eks. fra en fermenteringskraft, vil den gjenværende vandige blandingen etter den fri melkesyrefjerningen noen ganger refereres til som «fortynnet» med hensyn til fri melkesyre. På lignende måte når den laktatsaltanrikede strømmen resulterer fra separering av laktatsaltet fra blanding
15 inneholdende den fri melkesyren og laktatsaltet, vil den gjenværende blandingen noen ganger refereres til som «fortynnet» med hensyn til laktatsaltet.

Fortrinnsvis når løsningen som bearbeides er en fermenteringskraft, er produktstrømmen anriket på laktatsalt tilveiebrakt og dannes slik at vektforholdet av urenheter fra fermentoren, til laktatsalt deri, er lavere enn det funnet i
20 fermenteringskraften, fortrinnsvis med en faktor på minst 5. Dette kan håndteres ved teknikker beskrevet her som angår kontroll over den spesielt valgte metoden for isolering av laktatsaltet, samt ved anvendelse av forskjellige renseteknikker, slik som ettervasking eller rekrystallisering.

Fortrinnsvis er laktatproduktstrømmen tilslutt isolert som en vandig løsning eller
25 blanding av en vandig fase og en fast fase, for passende resirkulering inn i et fermenteringssystem, for å opprettholde vannbalansen. Hvis konsentrasjonen av en vandig løsning anvendes for å lette vannbalansen i kraften, anvendes fortrinnsvis relativt lavkostnads-konsentreringsteknikker slik som omvendt osmose og damprekompresjon.

30 Oppfinnelsen vil ytterligere beskrives ved henvisning til de følgende eksemplene. Disse eksemplene illustrerer men begrenser ikke rammen av oppfinnelsen som har er blitt fremsatt. Variasjoner innenfor konseptene av denne oppfinnelsen vil være åpenbare.

35

Eksempel 1 - Standard fermenteringsbetingelser

Med mindre noe annet er anført ble fermenteringsreaksjonene omtalt i de følgende eksemplene kjørt ved anvendelse av en rekke vekstmedier i henhold til den følgende standardprotokollen.

5 Celler (250 ul) ble ført fra en «bench stock» av den bestemte stammen i 40 % tomatjuice/40 % LSW-MRS-agar bunnfase/MRS toppfase bifase (TJ-SW-MRS bifase) i nytt TJ-SW-MRS bifasemedium og inkubert under statiske betingelser i 18-24 timer ved 47°C.

MRS Medium (pH = 6, 2)

- 10 10 g/l bukspytt av gelatin
- 8 g/l biffekstrakt
- 4 g/l gjærekstrakt
- 10 20 g/l glukose
- 2 g/l K₂HPO₄
- 1 g/l Tween^R 80
- 5 g/l natriumacetat
- 5 g/l ammoniumcitrat
- 15 0.2 g/l MgSO₄
- 0.05 g/l MnSO₄

20 En 1.0 ml alikvot av inkubatet i det ferske TJ-SW-MRS bifasemediumet ble anvendt til å inokulere 80 ml av medium B supplementert med 10 % CSL, glukose (60 g/l total konsentrasjon) og kalsiumkarbonat (20 g/l) i en forseglet serumflaske og inkubert under røring i 18 timer ved 47°C i en rører.

Medium B (pH = 4, 7)

- 8-12 vol.% maisekstraktvæske
- 5 g/l gjærekstrakt
- 50-100 g/l glukose
- 25 2 g/l K₂HPO₄
- 1 g/l Tween^R 80
- 2 g/l ammoniumcitrat
- 0.2 g/l MgSO₄
- 0.05 g/l MnSO₄
- 30 20-40 g/l CaCO₃

35 Fermentere inneholdende Medium B med de ønskede nivåene av glukose og kalsiumkarbonat (f.eks. 90 g/l glukose og 33.4 g/l kalsiumkarbonat) ble inokulert med 10 % (v/v) av den 18 timers gamle kulturen. Fermentering ble kjørt ved 47-49°C under røring ved 150 opm og fermenteringskrukker som var 70-80 % fulle. Kjøring av fermenteringskrukkene ved dette væskevolumnivået sikret at mediumet ikke ble særlig aerobt.

Eksempel 2 - Isolering av syre-tolerante homolaktiske stammer uten pH-kontroll

Homolaktisk bakteriestammer ble isolert fra prøver av kornekstraktvann oppnådd fra åtte forskjellig industrielle kornmølleanlegg. Anleggene var lokalisert i Blair, Nebraska, USA; Edyville, Iowa, USA; Cedar Rapids, Iowa, USA; Dayton, Ohio, USA; Memphis, Tennessee, USA; Istanbul, Tyrkia; Tillbury, England; og Bergen Op Zoon, Nederland.

Stammene ble isolert ved oppnåelse av prøvene av ekstraktvann fra kommersielle kornmølleanlegg. Prøvene ble plettert på 10 % CSL-MRS-agarplater (pH 5.0) og inkubert anerobt ved 47°C. Kolonier ble igjen utstrøket for isolasjon på 10 % CSL-MRS-agarplater. Isolatet ble så ført i et 40 % LSW-40 % tomatjuice-MRS-bunnfase/MRS-toppfase bifasemedium (pH 6.0) for vedlikeholdsformål. De isolerte stammene ble utsatt for screening for heterolaktisk produksjon ved å kontrollere dannelsen av gass (CO₂) i bunnen av røret. De homolaktiske isolatene ble så utsatt for screening i MRS-medium supplementert med 10 vol. % CSL og 30 g/l glukose for laktatutbytte og den optiske renheten av det produserte laktatet. Resultatene er vist i tabell 1.

De isolerte bakteriestammene ble identifisert som enten homolaktatproduserere («homolaktat») eller heterolaktatproduserere («heterolaktisk»). Basert på fermentering i MRS-medium supplementert med 10 vol. % maissekstraktvæske («CSL»), ble de isolerte homolaktiske bakteriestammene karakterisert uttrykt ved den totale laktatproduksjonen, sluttfermenteringspH og % L-laktat produsert (jfr. tabell 1). Siden ca. 50 % av laktatet i den tilsatte maissekstraktvæsken («CSL») typisk var D-laktat, ble stammer som produserte minst 70 % L-laktat ansett å være L-laktat-produserende stammer. Denne antagelsen ble bekreftet ved påfølgende forsøk under betingelser hvor D-laktat kontamineringsnivåer i produktet som oppstod fra ekstraktvannet tilstede i næringsstoffmediumet var lavere (f.eks. høyere laktatproduksjonsnivåer eller anvendelse av maissekstraktvann som har mer enn 80 % L-laktat (som en fraksjon av det totale laktatet)).

Fermenteringen ble utført ved 48°C under de standard betingelsene beskrevet i eksempel 1. Resultatene er vist i tabell 1.

Eksempel 3 - Isolasjon av syre-tolerante homolaktiske stammer ved anvendelse av tilsatt base

Et ytterligere sett av homolaktiske stammer ble isolert fra maissekstraktvannprøver oppnådd fra maismølleanleggene i Edyville (Iowa, USA), Cedar Rapids (Iowa, USA), og Blair (Nebraska, USA). Isolasjonsprosedyren som ble anvendt var den samme som beskrevet i eksempel 2. De isolerte homolaktiske stammene ble karakterisert basert på fermenteringer utført i Medium B supplementert med 10 vol. % CSL, 90 g/l glukose og 33 g/l CaCO₃. Den totale laktatproduksjonen og/eller prosenten av produsert L-laktat ble målt for dette settet av stammer. Resultatene er vist i tabell 2.

Tabell 2
Isolerte homolaktiske stammer

Stamme nr.	g/l Laktat	% L-laktat
90	62	81
92	67.9	59
95	62.47	44
99	63.17	78
103	58.53	75
104	65.18	75
109	66.26	83
114	58.6	46
117	47.99	62
127	49.54	44
129	68.75	77
132	59.12	95
133	60.37	95
134	28.87	63
136	54.1	41
139	66.08	47
140	57.18	94

5 **Eksempel 4 - Effekt av tilsatt base på laktatproduksjon**

En rekke stammer beskrevet i eksempel 2 som hadde blitt identifisert som L-laktatproduserere ble utsatt for screening for å undersøke effekten av tilsatt base (CaCO₃) på laktatproduksjonen. Fermenteringene ble utført ved 48°C i MRS-medium supplementert med 10 % CSL og 30 g/l glukose. For bestemmelsene gjort i 10 nærværet av tilsatt base, ble det anvendt MRS-medium supplementert med 10 % CSL, 30 g/l glukose og 20 g/l CaCO₃.

Tabell 3
Effekt av CaCO₃ på laktatproduksjon

Stamme #	Laktatproduksjon (g/l)	
	Ingen base	20 g/l CaCO ₃
6	21	42
10	20	32
14	23	37
19	17	33
21	26	49
22	19	34
23	28	47
24	18	46
41	24	48
42	27	49
43	23	42
44	24	39
45	21	37
46	21	47
47	21	37
51	24	37

5 **Eksempel 5 - L-laktatproduksjon**

Nivå av L-laktatproduksjon ble karakterisert for en rekke stammer beskrevet i eksempel 2. Fermenteringer ble utført ved 48°C i MRS-medium supplementert med 10 % CSL, 30 g/l glukose og 20 g/l CaCO₃.

Tabell 4
L-laktatproduksjon

10

Stamme #	% L-laktat	Laktat produsert (g/l)
10	87 %	39.12
14	79 %	21.11
21	85 %	38.56

23	85 %	35.69
24	84 %	37.78
41	86 %	38.10
42	83 %	30.62
43	80 %	25.17
44	84 %	31.75
46	86 %	36.12

Eksempel 6 - Laktatproduksjon av ATCC-deponerte Lactobacillusstammer

Laktatproduktiviteten av en rekke kjente Lactobacillusstammer isolert fra kilder som er andre enn maisestraktvann ble undersøkt. Prøver på 11 forskjellige stammer ble oppnådd fra The American Tissue/Culture Collection (Rockville, Maryland, USA) og utsatt for screening for total laktatproduksjon og sluttinkuberings-pH basert på fermentering ved 37°C i MRS-medium supplementert med 75 g/l glukose og 30 g/l kalsiumkarbonat. Resultatene er vist i tabell 5. Alle stammene viste dårlig vekst ved 47°C og ble inhibert ved nærværet av maisestraktvann i næringsstoffmediumet. Mens næringsstoffkravene til de ATCC-deponerte stammene er forskjellige fra stammene isolert fra maisestraktvann, synes flere av de ATCC-deponerte stammene å være i stand til å produsere relativt høye konsentrasjoner av fri melkesyre. Spesielt *Lactobacillus helveticus* (ATCC # 15009; 66 g/l laktat ved en sluttinkuberings-pH på 4, 03), *Lactobacillus paracasei* tolerans (ATCC # 25599; 66 g/l laktat ved en sluttinkuberings-pH på 4, 04), og *Lactobacillus salivarius salivarius* (ATCC # 11741; 64 g/l laktat ved en sluttinkuberings-pH på 4, 12) synes å tilby potensiale som høyproduktivtets fri melkesyreproduserere. Den optiske renheten av laktatet produsert ved en rekke av stammene ble fastsatt. Ingen av stammen som er istand til å produsere en relativt høy konsentrasjon av fri melkesyre var en L-laktatproduserende stamme.

Tabell 5
Laktatproduksjon av ATCC-
Lactobacillusstammer

ATCC #	Lactobacillus	Lak.	% L-Lak.	pH
12315	<i>L. delbrueckii lactic</i>	47	42	4.93
11741	<i>L. salivarius salivarius</i>	64	52	4.12
25302	<i>L. paracasei paracasei</i>	52	69	4.76
25258	<i>L. jensenii</i>	3	-	6.25
15009	<i>L. helveticus</i>	66	53	4.03

33409	L. delbrueckii bulgaricus	18	54	5.45
25599	L. paracasei tolerans	66	53	4.04
39392	L. casei casei	50	12	4.71
33323	L. grasseri	18	-	5.62
4536	L. acidophilus	40	-	5.43
35046	L. animalis	51	-	4.78

Eksempel 7 - SO₂-toleranse av homolaktisk stamme #41

Effekten av varierende nivåer av svoveldioksid (SO₂) på laktatproduktiviteten av den homolaktiske stammen # 41 ble undersøkt. Effekten av varierende svoveldioksidkonsentrasjon på laktatproduksjon ble undersøkt ved anvendelse av stamme # 41. Fermenteringene ble utført i MRS-medium supplementert med 10 vol.% CSL, 30 g/l glukose og 20 g/l Ca.CO₃ via den standard fermenteringsprotokollen beskrevet i eksempel 1. Resultatene vist i tabell 6 viser at stammen # 41 er i stand til å produsere laktat i nærværet av SO₂-konsentrasjoner på opptil minst 600 ppm. I lignende fermentering utført i nærværet av 800 ppm startet stamme # 41 å produsere laktat etter en hvilefase på 144 timer.

Tabell 6
SO₂-toleranse av homolaktisk stamme # 41

SO ₂ -kons.	Laktatproduksjon (g/l)		
	24 h	48 h	72 h
200 ppm	11	48	66
400 ppm	9	27	55
600 ppm	9	11	43

Eksempel 8 - Effekt av temperatur på laktatproduksjon

Laktatproduktiviteten av den homolaktiske stammen # 41 ble fastsatt over et temperaturområde på 41°C og 54°C. Fermenteringene ble utført i Medium B supplementert med 10 vol. % CSL, 60 g/l glukose og 20 g/l kalsiumkarbonat. Resultatene vist i tabell 7 viser at det optimale temperaturområdet for laktatproduksjon av stammen # 41 er fra 44°C til 54°C.

Tabell 7
Temperaturavhengighet av laktatproduksjon
Laktatproduksjon (g/l)

Temp. (°C)	24		
	24 h	48 h	72 h
41°	14	51	68
44°	25	55	68
47°	26	50	63
50°	31	52	57
54°	9	19	23

Eksempel 9 - Effekt av ekstraktvannkonsentrasjon på laktatproduksjon

5 Fermenteringer som anvender en rekke L-laktatproduserende stammer beskrevet i eksempel 2 ble utført for å undersøke effekten av varierende mengder av maissekstraktvæske i vekstmediumet på laktatproduksjonen. Fermenteringene ble utført ved 48°C i medium A (jfr. de som er anført under) supplementert med 50 g/l glukose, 20 g/l CaCO₃, og enten 1 %, 5 % eller 10 % CSL.

Medium A (pH = 5, 0)

- 10 10 g/l gjærekstrakt
- 0.2 % K₂HPO₄
- 1 g/l Tween^R 80
- 0.2 % ammoniumcitrat
- 0.005 % MnSO₄·4H₂O
- 0.02 % MgSO₄·7H₂O
- 15 Tilsatt karbon/energikilde
- Tilsatt nitrogenkilde
- CaCO₃ tilsatt for å modulere pH

20 **Tabell 8**

Effekt av ekstraktvann på laktatproduksjon

Stamme #	Laktatproduksjon (g/l)		
	1 % CSL	5 % CSL	10 % CSL
10	1	19	31
23	1	10	32
24	1	6	22
41	1	9	33
45	1	8	35

Eksempel 10 - Karakterisering av homolaktiske stammer basert på ribotype

En rekke av de L-laktatproduserende homolaktiske bakteriestammene isolert fra maisekstraktvann ble kategorisert basert på ribotrykkmønstreanalyse (jfr. f.eks. Jaquet et al., Zbl. Bakt. 276, 356-365 (1991)). Denne teknikken er basert på
 5 digestion av DNA fra en enkel koloni av den aktuelle stammen ved anvendelse av et EciRI restriksjonsenzym og hybridisering etter størrelsesseparasjon på en agarosegel med en kjemisk merket rRNA operon fra E. coli. Det resulterende mønsteret er en direkte indikator på genetiske forhold mellom organismer og har
 10 blitt anvendt for å skaffe identifikasjon mellom fire slekter av bakterier (Salmonella, Listeria, Staphylococcus og E.coli) samt for den taksonomiske identifikasjonen av nær beslektede gram positive og gram negative stammer.

Resultatene av ribotypifisering av syv av de laktatproduserende stammene isolert fra maisekstraktvann er vist i figur 2. Stammer gitt i den samme RiboGroup designeringen er sannsynlig og identifiseres til det samme utbredelsesnivået som
 15 identisk. De viste ribotypene av de syv stammene vist i figur 2 matchet ikke mønstrene til enhver av 30 forskjellige melkesyre-bakteriestammer i en kommersiell laboratoriedatabase. Blant stammene i databasen som ikke ga en tilsvarende matching var *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus animalis*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus amylovorus* og *Lactobacillus salivarius*. Ribotypene av stammene opplistet i figur 2 ga heller ikke en tilsvarende
 20 matching med mønstrene fra *Lactobacillus agilis*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus confusus*, *Lactobacillus coryniformis*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus farciminis*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus murinus*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus sake* og
 25 *Lactobacillus suebicus*. Ribotypemønstrene vist i figur 2 ga heller ikke en tilsvarende matching med *Lactococcus garviae*, *Lactococcus lactis* og *Lactococcus raffinolactis* eller med *Leuconostoc carnosum*, *Leuconostoc citreum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc paramesenteroides*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus dextrinicus* og *Pediococcus pentosaceus*.

Ribotypemønstrene av de syv stammene vist i figur 2 faller i tre RiboGroups. To stammer (# 114 og # 119) har identiske ribotyper. En av disse stammene er en heterolaktisk stamme (# 119) mens den andre er en homolaktisk stamme som produserer racemisk laktat (# 114). Den ene av D-laktatproduserende stammen (# 79) viste et ribotypemønster som var forskjellig fra de andre seks. De gjenværende
 35 fire stammene (# 90, 127, 132 og 140) ble klassifisert i den samme RiboGroup og ble ansett å være sannsynlig å identifiseres til det samme utbredelsesnivået, til tross for det faktum at deres ribotypemønstre ikke var identiske. Av de fire stammene med et MIL 4-1132 mønster, var tre L-laktatproduserende stammer (# 90, 132 og 140) mens den fjerde (# 127) produserte racemisk laktat.

40 **Eksempel 11 - Effekt av tilsatt base på laktatproduksjon**

Effekten av tilsetningen av forskjellige mengder av CaCO_3 på laktatproduktivitet og homolaktisk stamme # 41 ble undersøkt. Forsøkene ble utført ved 47°C i Medium A supplementert med 8 vol. % CSL, 200 g/l glukose og varierende mengder av tilsatt kalsiumkarbonat (30-90 g/l). Resultatene er vist i tabell 9.

Tabell 9
Effekt av CaCO_3 på laktatproduksjon

CaCO ₃ kons.	Laktatproduksjon (g/l)					
	0 h	24 h	51 h	120 h	Slutt-pH	
30 g/l		3.17	48.1	75.5	75.7	3.
40 g/l		6.12	53.4	81.3	87.0	4.
50 g/l		5.84	49.4	83.4	88.1	4.
60 g/l		3.21	50.2	75.4	77.2	4.
70 g/l		4.85	48.9	75.3	73.8	4.
80 g/l		3.45	54.4	61.1	83.6	4.
90 g/l		5.39	49.6	57.8	83.6	4.

10

Eksempel 12 - Fermenteringsprofil av stamme # 41 med 12 % CSL, 90 g/l glukose og 33.4 g/l CaCO_3

Figur 3 viser pH-profilen og de organiske komponentene i fermenteringskraften som en funksjon av tid under forløpet av et representativt fermenteringsforsøk. Profilen vist i figur 3 er basert på resultater oppnådd fra inkubering ved 47°C av stamme # 41 i Medium B supplementert med 10 vol. % CSL, 100 g/l glukose og 33.4 g/l kalsiumkarbonat.

15

Eksempel 13 - Fermenteringsprofil av stamme # 41 med 90 g/l glukose, 33.4 g/l CaCO_3 og 12 % CSL/36 % LSW

Figur 4 viser laktatproduksjon som en funksjon av tid under forløpet av representativ fermenteringsforsøk med stamme # 41. Fermenteringene ble utført ved anvendelse av prosedyren omtalt i eksempel 1. Profilen vist i figur 4 er basert på resultater oppnådd fra inkubering av stamme # 41 ved 47°C i medium C supplementert med 90 g/l glukose, 33.4 g/l kalsiumkarbonat og enten 12 vol. % CSL (36 vekt % tørrstoffer) eller 36 vol. % LSW (12 vekt % tørrstoffer). Resultatene som er oppsummert i tabell 10 sluttnivåer av fri melkesyre på ca. 40 g/l fri med begge kilder av maissekstraktvann. Siden laktatet ble produsert med en L-

20

25

laktatproduserende stamme (# 41), var minst 35 g/l fri L-melkesyre tilstede ved avslutningen av disse fermenteringene (det gjenværende er fri D-laktat tilstede i det tilsatte ekstraktvannet).

5

10

Tabell 10
Laktatproduksjon med stamme # 41

	Maisetraktvannkilde	
	12 % CSL	36 % LSW
Laktat g/l		
0 h	10.3	8.4
16 h	44.0	52.4
24 h	80.5	92.2
44 h	91.5	96.8
Slutt-pH	3.92	3.98
Siste frie laktat (g/l)	42	41

Eksempel 14 - Laktatproduksjon av stamme # 41 med 8-12 % CSL, 90 g/l glukose og 36.6 g/l CaCO₃

Figur 5 viser laktatproduksjon som en funksjon av tid under forløpet av representative fermenteringsforsøk med stamme # 41. Fermenteringene ble utført ved anvendelse av en modifisert versjon av prosedyren beskrevet i eksempel 1. Celler av stamme # 41 ble for-vokst i 800 ml av medium og deretter separert fra mediumet. De for-vokste cellene ble så på nytt suspendert i 800 ml av fersk medium. Profilen vist i figur 5 er basert på resultater oppnådd fra inkubering av de for-vokste cellene ved 47°C i Medium B supplementert med 90 g/l glukose, 36.6 g/l kalsiumkarbonat og enten 8 vol. % CSL (36 vekt % tørrstoffer), 12 vol. % CSL, 24 vol. % LSW (12 vekt % tørrstoffer) eller 36 vol. % LSW.

15

20

25

Tabell 11
Laktatproduksjon med stamme # 41

Maisetraktvannkilde	Slutt-pH	Laktat	Fri laktisk
---------------------	----------	--------	-------------

8 % CSL	3.83	93 g/l	47 g/l
24 % LSW	3.90	94 g/l	44 g/l
12 % CSL	3.80	97 g/l	52 g/l
36 % LSW	3.81	99, 5 g/l	53 g/l

Eksempel 15 - Effekt av tilsatt glukose på laktatproduksjon

Effektene av varierende mengder av en tilsatt karbohydratkilde (glukose) på laktatproduksjon ble undersøkt for den homolaktiske stammen # 41.

- 5 Fermenteringene ble kjørt ved inkubering av # 41-stammen ved 48°C i Medium A supplementert med 10 vil. % CSL, 20 g/l CaCO₃ og det indikerte nivået av glukose ved anvendelse av standard fermenteringsprosedyren beskrevet i eksempel 1. Mediumet inneholdt også en ytterligere 1-15 g/l fermenterbar sukker (hovedsakelig glukose og fruktose) fra maissekstraktvæsken. Resultatene er vist i tabell 12.
- 10 Resultatene av dette forsøket antyder at minst for nivået av tilsatt base (20 g/l CaCO₃), kan laktatproduktiviteten økes ved tilsetningen av minst 50 g/l av en karbohydratkilde slik som glukose.

Tabell 12
Effekt av glukose på laktatproduksjon

Tilsatt glukose	Laktatproduksjon g/l		
	24 h	48 h	72 h
30 g/l	14	39	42
50 g/l	11	51	55
80 g/l	11	50	67
100 g/l	9	47	65

15 Oppfinnelsen har blitt beskrevet med referanse til forskjellige spesifikke og foretrukne utførelser og teknikker. Det skal forstås at mange variasjoner og modifikasjoner kan gjøres innenfor rammen av den foreliggende oppfinnelsen.

TABELL 1
Isolerte homolaktiske stammer

Stamme nr.	g/l laktat	pH	% L-laktat
1	16.7	4.04	34
2	19.4	3.97	36

3		4.51	
5	8.1	5.22	18
6	18.4	4.02	69
7	17.5	4.03	38
8	23.8	4.51	43
9	25.1	4.29	34
10	23.6	4.33	73
11	26.2	4.3	37
12	24.6	4.32	36
13	21.6	4.22	54
14	24.3	4.15	77
15	24.2	4.13	51
16	21.3	4.25	64
17	18.1	4.34	39
18	25.2	4.28	74
19	10.4	5.06	35
20	25.3	4.14	69
21	23.1	4.17	76
22	22.4	4.21	75
23	28.6	4.12	78
24	22.8	4.19	41
25	22.6	4.19	44
26	8.1		17
27	23.7	4.19	48
28	22	4.21	44
29	21.1	4.18	51
30	23.6	4.15	47
32	20.4	4.15	46
34	19.5		41
35			40

36			35
37			37
38			42
39			62
40			36
41	24.5	4.17	76
42	25.9	4.25	75
43	25	4.26	74
44	26.2	4.28	74
45	25.9	4.27	74
46	27.4	4.25	76
47	26	4.27	73
48	13.3	4.54	47
49	28.4	4.19	47
50	29.2	4.21	47
51	26.1	4.22	76
52	30.6		48
55			2
56			31
57			32
58			0
59			0
60			0
61			45
62			88
63			5
64			92
65			41
66			4
67			5

68			5
69			49
70			48
71			44
72			5
73			5
74			5
75			3
76			2
77			4
78			3
79			3
80			3
81	15.8		
82	16.7		
83	39.9		55
84	14		
85	14.2		
86	8.1		
87	8.4		
88	46.1		55

PATENTKRAV

1. Fremgangsmåte for fremstilling av melkesyre, karakterisert ved:

(a) inkubering av en syretolerant homolaktisk bakteriestamme i næringsstoffmedium ved en inkuberings-pH tilstrekkelig til å tillate fremstilling av melkesyre av den syretolerante homolaktiske bakteriestammen i næringsstoffmediumet, hvor sluttinkubasjons-pH er pH 4,0 eller mindre, og inkuberingstrinnet er tilveiebragt ved en temperatur på minst 30°C for å fremstille:

(i) en oppløsning omfattende minst 25 g/l fri L-melkesyre eller minst 25 g/l fri D-melkesyre;

(ii) fri melkesyre ved en totalhastighet på minst 1,0 g/l/h; og

(iii) oppløsningen omfatter minst 25 g/l fri L-melkesyre eller minst 25 g/l fri D-melkesyre, hvor den fri L-melkesyre er tilveiebragt ved en optisk renhet på minst 50 % eller den fri D-melkesyren er tilveiebragt ved en optisk renhet på minst 50 %; og

(b) utvinning av fri melkesyre.

2. Fremgangsmåte ifølge krav 1, karakterisert ved at det ved inkubering av bakteriestammen i næringsstoffmediumet fremstilles en oppløsning omfattende minst 40 g/l fri L-melkesyre.

3. Fremgangsmåte ifølge krav 1, karakterisert ved at den omfatter inkubering av bakteriestammen ved 35°C til 53°C.

4. Fremgangsmåte ifølge krav 1, karakterisert ved at næringsstoffmediumet omfatter minst 15 g/l maisekstraktvannfaststoffer.

5. Fremgangsmåte ifølge krav 1, karakterisert ved at næringsstoffmediumet omfatter minst 50 g/l karbohydrat.

6. Fremgangsmåte ifølge krav 1, karakterisert ved at næringsstoffmediumet omfatter base.

7. Fremgangsmåte ifølge krav 1, karakterisert ved at næringsstoffmediumet omfatter et laktatsalt.

8. Fremgangsmåte ifølge krav 1, karakterisert ved at den omfatter inkubering av bakteriestammen ved en temperatur på minst 47°C for å fremstille en oppløsning inneholdende minst 40 g/l fri L-melkesyre;

hvor næringsstoffmediumet omfatter (i) minst 25 g/l maisekstraktvannfaststoffer, (ii) minst 50 g/l glukose eller 50 g/l fruktose, eller 50 g/l av en blanding derav, og (iii) minst 20 g/l CaCO₃.

9. Fremgangsmåte ifølge krav 8, karakterisert ved at næringsstoffmediumet ytterligere omfatter gjærekstrakt.

10. Fremgangsmåte ifølge krav 8, karakterisert ved at næringsstoffmediumet ytterligere omfatter ikke-ionisk overflateaktivt stoff.

11. Fremgangsmåte ifølge krav 6, karakterisert ved at basen omfatter kalsiumkarbonat, natriumhydroksid, ammoniumhydroksid, natriumbikarbonat eller en blanding derav.

12. Fremgangsmåte ifølge krav 7, karakterisert ved at laktatsaltet omfatter kalsiumlaktat, natriumlaktat, ammoniumlaktat eller en blanding derav.

13. Fremgangsmåte ifølge krav 1, karakterisert ved at den omfatter:

(a) inkubering av en syretolerant homolaktisk bakteriestamme i næringsstoffmedium omfattende maisekstraktvann ved en inkuberings-pH tilstrekkelig til å tillate fremstilling av melkesyre av den syretolerante homolaktiske bakteriestammen i næringsstoffmediumet, hvor sluttinkuberings-pH er pH 4,2 eller mindre, og inkuberingstrinnet er tilveiebragt ved en temperatur på minst 30°C for å fremstille:

(i) en oppløsning som har minst 25 g/l fri L-melkesyre eller minst 25 g/l fri D-melkesyre; og

(ii) oppløsningen har minst 25 g/l fri L-melkesyre eller minst 25 g/l fri D-melkesyre, hvor den fri L-melkesyren er tilveiebragt ved en optisk renhet på minst 80 % eller den fri D-melkesyren er tilveiebragt ved en optisk renhet på minst 80 %;

(b) utvinning av fri melkesyre.

14. Fremgangsmåte ifølge krav 13, karakterisert ved at den syretolerante homolaktiske bakteriestammen fremstiller minst 40 g/l fri melkesyre.

15. Fremgangsmåte ifølge krav 13, karakterisert ved at den syretolerante homolaktiske bakteriestammen fremstiller minst 40 g/l fri L-melkesyre ved en inkuberingstemperatur over ca. 47°C.

16. Fremgangsmåte ifølge krav 13, karakterisert ved at næringsstoffmediumet omfatter minst 15 g/l maisekstraktvannfaststoffer.

17. Fremgangsmåte ifølge krav 13, karakterisert ved at base ikke tilsettes under inkuberingstrinnet.

FIG.1

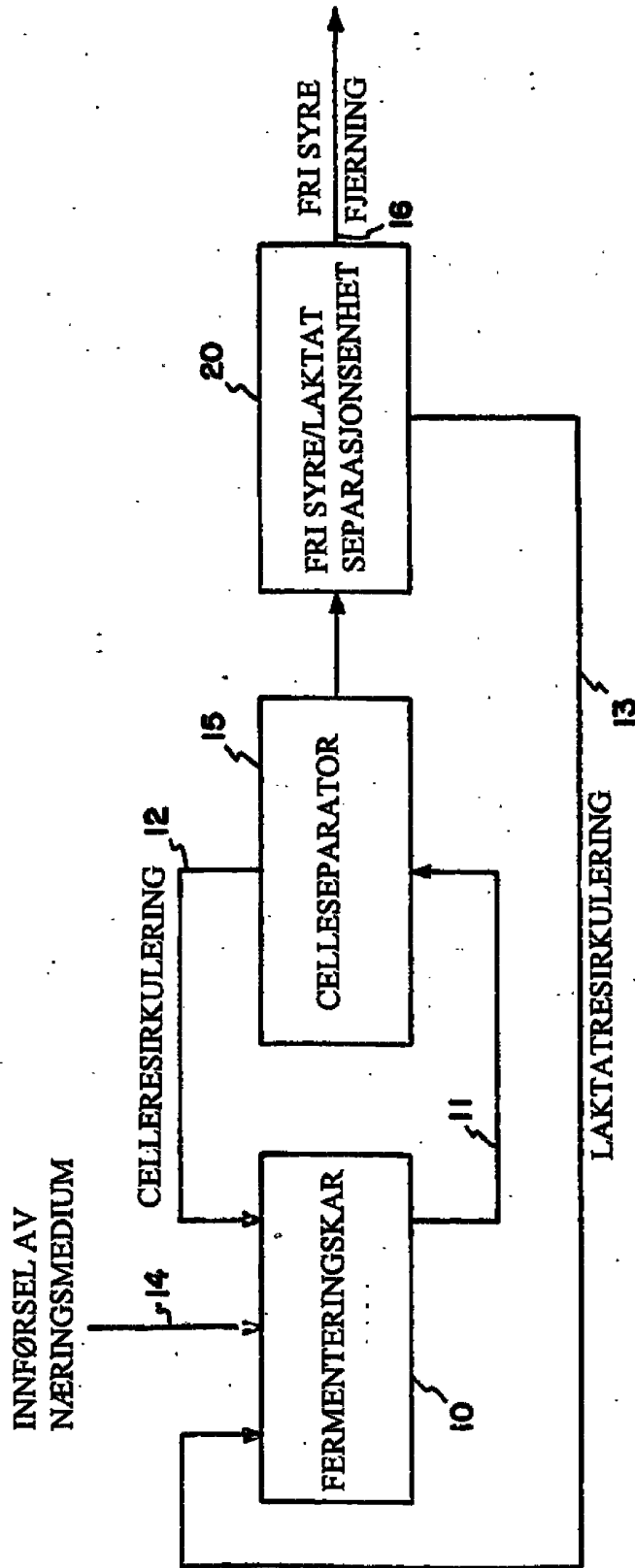


FIG. 2

RIBO GRUPPE STAMME #

MIL 4-1132-S-1 127

MIL 4-1132-S-2 132

MIL 4-1132-S-3 140

MIL 4-1132-S-7 90

MIL 4-1135-S-4 114

MIL 4-1135-S-4 119

MIL 4-1132-S-8 79

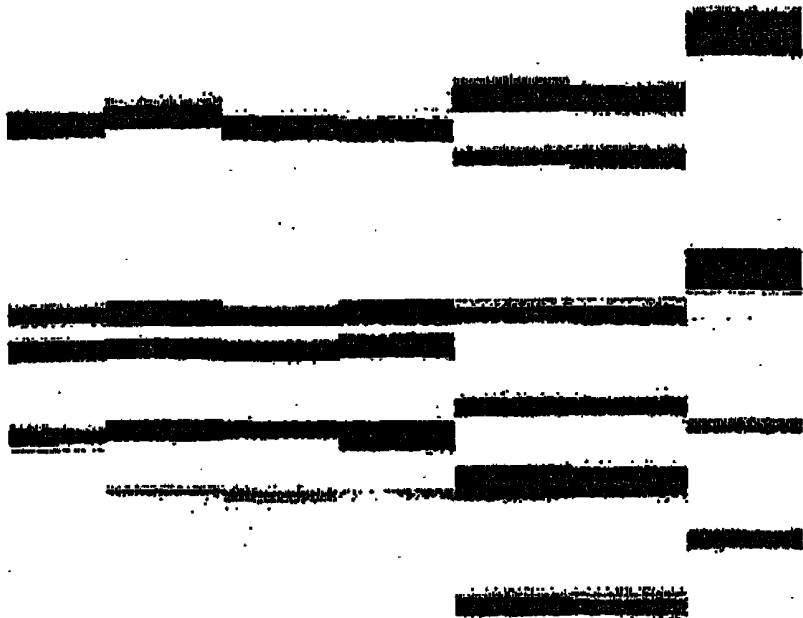


FIG. 3

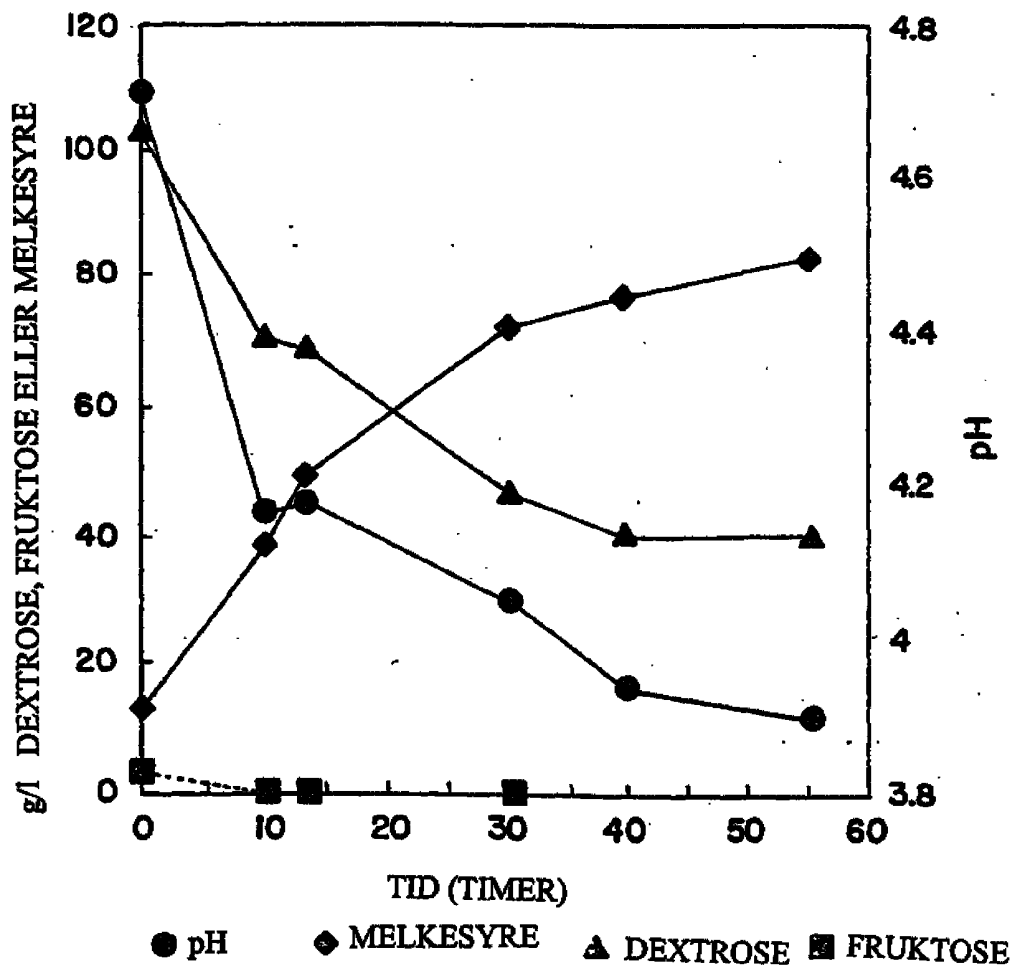


FIG. 4

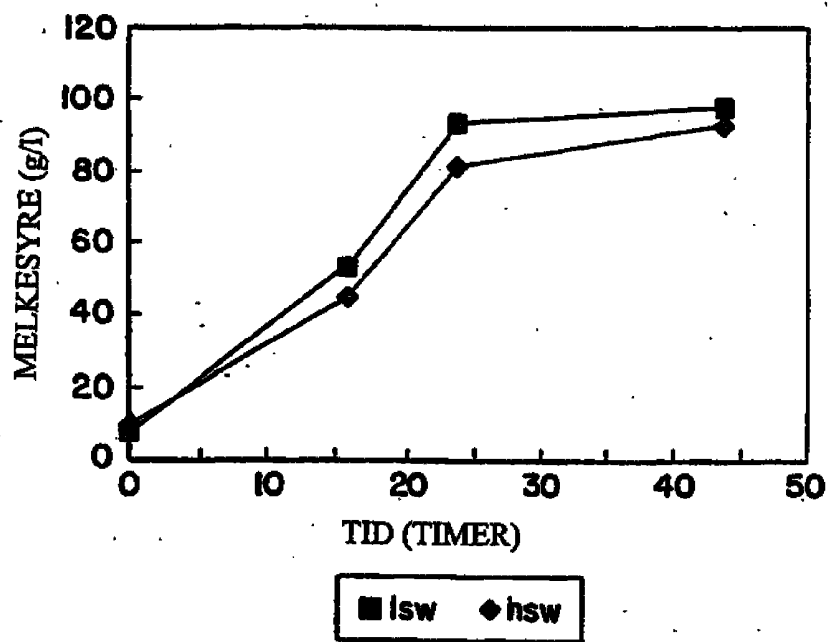


FIG. 5

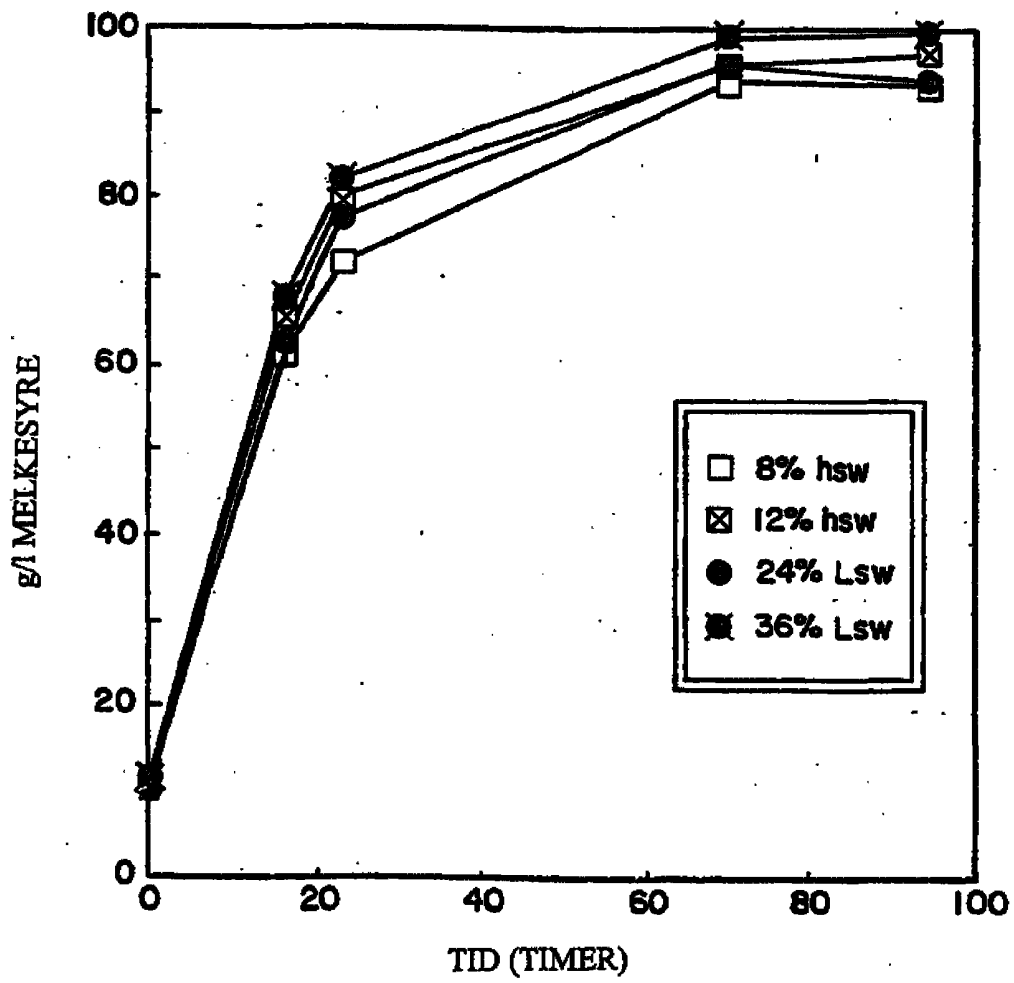


FIG. 6

