

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01137869.7

[43] 公开日 2002 年 6 月 12 日

[11] 公开号 CN 1353191A

[22] 申请日 2001.11.9 [21] 申请号 01137869.7
[30] 优先权
[32] 2000.11.9 [33] FR [31] 0014398
[71] 申请人 火箭兄弟公司
地址 法国莱斯特拉姆
[72] 发明人 J-J·卡博彻 P·杜福勒特
C·福阿克 L·塞古尔哈

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事
务所
代理人 王 杰

权利要求书 2 页 说明书 20 页 附图页数 0 页

[54] 发明名称 一种从可更新的原料制备发酵培养基的方法

[57] 摘要

本发明涉及一种从可更新的原料制备用于生产高纯度代谢物的发酵培养基的方法,其特征在于该方法包括:任选地处理所述的可更新的原料,以使其富含能被微生物直接同化的碳源或氮源,并清除不溶性杂质;独立地或组合使用选自纳米级过滤和电渗析的技术,以从所述可更新的原料除去低分子量杂质,而不降低能被直接同化的碳源的浓度;对通过上述方式已除去低分子量杂质的原料进行处理,以补充能被微生物直接同化的碳源或氮源;和回收所得的发酵培养基。

ISSN 1008-4274

权 利 要 求 书

1. 一种从可更新的原料制备用于生产高纯度代谢物的发酵培养基的方法，其特征在于该方法包括：

a) 任选地，处理所述的可更新的原料，以使其富含能被微生物直接同化的碳源或氮源，并清除不溶性杂质，

b) 独立地或组合使用选自纳米级过滤和电渗析的技术，以从所述可更新的原料除去低分子量杂质，而不改变能被直接同化的碳源的浓度，

c) 对通过上述方式已除去低分子量杂质的原料进行处理，以补充能被微生物直接同化的碳源或氮源，和

d) 回收所得的发酵培养基。

2. 根据权利要求1的方法，其特征在于由发酵生成的代谢物选自有机酸、维生素、氨基酸和抗生素，优选有机酸。

3. 根据权利要求2的方法，其特征在于所述有机酸是L-乳酸。

4. 根据权利要求1-3中任一项的方法，其特征在于可更新的原料选自淀粉生产所得的副产物，优选来自麦、玉米、木薯、马铃薯的淀粉生产所得的副产物，或者加工大麦和豆所得的副产物，优选包括麦溶解物或玉米浆。

5. 根据权利要求1-3中任一项的方法，其特征在于可更新的原料选自乳品、豆、糖甘蔗、制糖甜菜的加工所得的副产物，优选包括乳清或糖浆。

6. 根据权利要求1-4中任一项的方法，其特征在于可更新的原料富含碳源，该碳源能通过使用用于液化和糖化淀粉的酶和任选地用能降解植物纤维的酶而被微生物同化，选自半纤维素、果胶酶和木聚糖酶。

7. 根据权利要求1-6中任一项的方法，其特征在于选自碱性蛋白酶和酸性蛋白酶的解蛋白酶用于使可更新的原料富含或补充能被同化的氮源。

8. 根据权利要求1-6中任一项的方法，其特征在于加入葡萄糖以向可更新的原料补充能被同化的碳源。
9. 通过根据权利要求1-8中任一项的方法得到的发酵培养基。
10. 根据权利要求9的发酵培养基在生产微生物群体中的用途。

说明书

一种从可更新的原料制备发酵培养基的方法

发明领域

本发明涉及一种从可更新的原料制备发酵培养基的特定方法。

更具体地说，本发明涉及一种加工可更新的原料的特定方法，使得该原料可以直接在发酵中用于生产高纯度的代谢物，而不必要进行多个费时且昂贵的提纯步骤来分离代谢物。

发明背景

在本发明的公开中，术语“可更新的原料”指来自食品工业的废料，它是廉价的、未精制的且通常是无毒的，并富含氮和碳源。

在本发明的公开中，术语“代谢物”指通过能直接被微生物同化的碳源发酵而转变得到的产物。它们是有利的代谢物，选自有机酸、维生素、氨基酸和抗生素，优选有机酸，例如 L-乳酸。

通常认为，所述可更新的原料的选择是基于其可行性、成本和达到高产率的潜力。

还认为，发酵培养基必须含有碳源和氮源，并向其中加入矿物质和有机盐。

“碳源”可以从可更新的原料获得，例如糖浆，来自小麦、玉米、大米、木薯或马铃薯的淀粉水解物，但“能直接被同化的碳源”是从所述碳源精制或纯化得到的糖，例如葡萄糖、果糖、麦芽糖、蔗糖、乳糖和糊精。

“氮源”或蛋白质类营养素的例子是酵母抽提物、玉米浆、非变性乳品、糖浆蛋白、肉羹或豆粉。但是，通常优选使用酵母抽提物作为氮源，并提供额外的维生素和矿物质。

包括“能直接被同化的碳源”即葡萄糖或蔗糖的或包括酵母抽提物的发酵培养基可以基本上用于多种发酵方法，例如用于生产有机酸的发酵方法，有机酸例如乳酸、丙酸、葡糖酸、柠檬酸等酸类，基础

氨基酸，例如赖氨酸，抗生素或任何其它有工业价值的代谢物。

这些培养基还适用于生产生物量（例如，用于制备乳酸酵素（lactic ferments））。

但是，认为这些培养基的缺点是不能从它们外推以工业规模生产相同的经济可行的代谢物（因为难以提供具有标准组成的培养基，和因为从随后纯化步骤产生的额外费用）。

为了降低成本，所以必须选择使用这样的发酵培养基，其中氮源或烃源的一种通过价廉的原料提供，并对发酵培养基的其它组分进行精制或纯化。

为了制备有机酸例如乳酸，例如：

-美国专利 5416020 描述了一种从乳清和乳清的渗透物制备 L-乳酸的方法，但酵母抽提物也在二价锰的存在下加入，其含有戴尔布吕克氏乳杆菌保加利亚亚种 ATCC 55163 (*Lactobacillus delbrueckii* sub. *bulgaricus*) 的突变菌株，其基本上制得 L-乳酸。

乳清的渗透物确实含有 75-80 重量%的乳糖，但不含有任何大量的蛋白质。所以其缺乏对于微生物的生长所必要的氮源。因此需要加入酵母抽提物。所加入的乳清基本上含有约 65-70 重量%的乳糖。

然后酵母抽提物提供了含有营养素的发酵培养基，其不能通过乳清的渗透物或乳清本身来充足地供应。

美国专利 4467034 显示可能从作为原料的乳清制备乳酸，使用新菌株保加利亚乳杆菌 DSM 2129。

但是，乳清必须仍然具有额外的氮源，即肉羹、玉米浆或豆粉，并含有维生素和无机盐。

尽管在以上条件下使用这些发酵培养基会略微降低所用原料的成本，但需要慎重地选择氮/碳比例的组合，以及为达到有效产率所必需的添加剂。

此外，这些“重组”的培养基不适合生产高纯度的代谢物，例如乳酸，其必须然后通过许多标准方法来分离和提纯，例如膜分离、离子交换、溶剂萃取、电渗析和乳酸盐的沉淀。

在用乳杆菌 (*Lactobacillus*) 制备光学纯的乳酸方面, 美国专利 4769329 解释了为了促进微生物的生长, 必要的是加入许多不能自己生产的物质, 例如生物素、维生素 B₁、烟酸、吡哆胺、对氨基苯甲酸、泛酸和维生素 B₁₂。

以上组分必须以复合培养基的形式加入, 例如由 MAN、ROGOSA 和 SHARPE 开发的 MRS 培养基, 尽管该方法不能用于工业生产乳酸 (因为成本过高, 且难以获得标准组成的培养基)。

复合培养基例如制糖甜菜、或蔗糖蜜或玉米浆, 它们尽管能促进细菌的生长, 但是不能用于制备光学纯的乳酸, 因为它们本身含有显著量的外消旋乳酸。

光学纯的酸可以从所述的外消旋混合物仅仅通过沉淀和重结晶 D-乳酸和 L-乳酸的盐来获得, 该方法是复杂且昂贵的。

为了得到光学纯的乳酸, 美国专利 4769329 建议使用 baker 酵母作为维生素、氮、糖和痕量矿物元素的来源。该培养基还含有葡萄糖、蔗糖或乳糖作为碳源, 它们能直接被同化, 并能转化成乳酸。

所以必要的是恢复使用精制的且昂贵的培养基来生产高纯度代谢物, 在这种情况下是光学纯的高纯度乳酸。

已提出许多解决方案来尝试解决上述现有技术的问题。

第一个解决方案是使用对特定发酵条件有特殊抵抗力的微生物, 或使用微生物的混合物。第二个解决方案是对可更新的原料进行预处理。这两个解决方案也可以组合。

在美国专利 4963486 中, 例如使用玉米作为可更新的原料, 这受限于其与 *Rhizopus oryzae* 的组合, 它具有贡献用于糖化原料的酶以及用于将其发酵制成 L-乳酸的独特能力。

发酵在 20-40℃ 温度下进行, 优选 30℃。必须加入中和剂以稳定 pH 值。碳酸钙是优选的, 因为它具有形成乳酸钙的特定特征, 乳酸钙在 4℃ 下沉淀, 并能选择性地回收高纯度乳酸。

但是纯化乳酸的方法不是最优化的, 因为该方法产生大量对环境有害的石膏。

美国专利 5464760 指出通常是无毒的并能直接发酵的食品废产品的充足供应，提供了大量和浓缩的用于各种需氧和厌氧细菌的碳和氮源。乳酸然后可以直接从乳清、糖甘蔗或制糖甜菜通过各种乳杆菌类型的乳酸菌，通过从玉米、马铃薯或大米中水解淀粉，然后用所述微生物进行生物转化而以高产率制得。

但是，必要的是使用乳酸菌的五种菌株的混合培养基并进行糖化和发酵。

淀粉被部分液化，然后经受特定的 pH 和温度条件，该条件能使葡糖淀粉酶同时作为乳酸菌而被引入。

但是不建议使用该解决方案，因为认为水解的淀粉，例如从马铃薯废料制得的马铃薯的水解产物，或从任何淀粉生产者得到的葡糖浆，通常含有最高 5% 的“糖杂质”，即戊糖、麦芽糖和寡糖，其在发酵结束时保持未使用，或被转化成其它副产物例如乙酸，这引起在随后纯化步骤中的问题。

仍然必要的是加入另一种基于有机和无机盐和酵母抽提物的营养素。

根据 MOTOYOSHI 等人在 Appl. Environ. Microbiol, 1986, 52(2), 314-319 中所述，甚至必要的是当在发酵培养基中形成乳酸时，通过连续电渗析除去乳酸，以避免所引入的微生物群体不平衡。

相似地，TIWARI 等在 Zbl. Bakt. II. Abt. Bd., 134, 544-546(1970) 中描述了使用含有保加利亚乳杆菌、干酪乳杆菌、含有或不含戴尔布吕克氏乳杆菌的、以及含有稀释糖浆的混合培养基来生产乳酸。

该技术用于试图提高从糖浆制备乳酸的产率。

但是，该产率至多不超过 57.9%，且菌株通常在其相应的生产容量方面互相干扰。

至于第二个解决方案，其包括对可更新的原料的特殊处理，美国专利 3429777 发明的一个目的是利用乳酸镁的突出特性，即从含有足够纯度的糖浆的发酵培养基中自发结晶，从而由所述乳酸镁生产高纯度的乳酸。

所以，与文献中所述的常用方法例如使用钙的方法相比，看来使用镁的方法较简单和较经济。但是，乳酸镁在“加糖的原液”中的纯度确实随着所用可更新的原料的性质和质量而变化，即使其质量比乳酸钙的质量好。

最后，第三个解决方案包括允许使用微生物和对引入发酵培养基的可更新原料进行处理。

例如，通常推荐淀粉作为便宜的碳源，但不是所有微生物能都对其起代谢作用，而大多数微生物能代谢葡萄糖。

所以，在 FR 2635534 中所述的方法在至少一种糖化淀粉酶的存在下进行乳酸发酵，但其中没有公开任何从以这种方式处理的发酵培养基清除杂质的方法。

MANHEIM 和 CHERYAN 在 JAOCSS, 69, 12, 1992 中描述了可控地使用水解酶和用于分离特定的麦谷蛋白级分的膜技术。这些技术还可以推广到大豆。

为了促进从麦谷蛋白粉得到的蛋白质食品的更广泛应用，研究小组开发了使用蛋白酶来改进其部分功能性能。

但是，没有描述或暗示在发酵工业中使用这些蛋白质，或从所述发酵培养基制备容易纯化的代谢物。

其它策略没有显著改进发酵培养基，而是保证生产菌株的生长以加快微生物产生的速率和对乳酸高浓度的抵抗性。

为此目的的传统途径是生物量循环和固定细胞。

在这种情况下，乳酸必须在生成时被回收，以防止其抑制细菌的生长和产生。

各种与发酵组合的技术已用于从发酵培养基中连续地除去乳酸，即渗析、电渗析、离子交换树脂、两种颗粒的流化床生物反应器、反向渗透和液液萃取。

但是，培养基的成本则占总生产成本的 30% 以上。所以，价廉的营养素是必要的。

所以显然的是，已进行许多尝试来降低生产高纯度代谢物例如乳

酸的成本。

但是，从上述讨论可见，仍然需要简单有效的通过发酵来生产易于提纯的代谢物的方法，且不需要使用许多复杂和昂贵的工艺步骤来制备发酵培养基或从发酵培养基回收所述代谢物。

所以，必要的是开发能清除所有杂质的发酵条件，这些杂质通常伴随着经济可行的代谢物的生产而产生且最重要的是使其纯化复杂化。

在乳酸的情况下，这些杂质意味着已经存在于可更新的原料中的D-乳酸和L-乳酸的外消旋混合物，以及所有上述在发酵结束时堵塞培养基的“糖杂质”。

发明概述

对于开发比现有方法对实际限制有更好的解决途径的方法，申请人已发现该目的可以通过这样的方法来实现，该方法包括通过酶催步骤和特定的分离步骤的组合来处理可更新的原料，其中酶催步骤用于从其中释放出能直接被微生物同化的碳源和氮源，特定的分离步骤通过微量过滤和纳米级过滤或电渗析来进行，以从培养基中除去可能改变要分离的代谢物的质量和能阻碍和/或使随后的纯化步骤复杂化的所有组分。

那么，申请人开发的方法可以有利地用于生产任何经济可行的代谢物，优选生产选自有机酸、维生素、氨基酸和抗生素的代谢物。

根据本发明的方法特别适用于制备选自有机酸的代谢物，优选L-乳酸。

如下所述，申请人开发的方法可以同样地用于生产经济可行的微生物群体，因为其提供没有可能污染所述群体的杂质或没有特定的生长抑制剂的发酵培养基。

本发明的从可更新的原料制备用于生产高纯度代谢物的发酵培养基的方法的特征在于其包括：

a) 任选地处理所述的可更新的原料，以使其富含能被微生物直接同化的碳源或氮源，并清除不溶性杂质，

b) 独立地或组合使用选自纳米级过滤和电渗析的技术, 以从所述可更新的原料除去低分子量杂质, 而不改变能被直接同化的碳源的浓度,

c) 对已通过上述方式除去低分子量杂质的原料进行处理, 以便补充能被微生物直接同化的碳源或氮源, 和

d) 回收所得的发酵培养基。

具体实施方案的描述

本发明的第一步任选地包括处理可更新的原料, 以使其富含能被微生物直接同化的碳源或氮源, 并从其中清除不溶性杂质。

上述处理可以根据可更新的原料的性质而变化。

在本发明方法的第一个实施方案中, 可更新的原料选自生产淀粉例如从来自麦、玉米、木薯、马铃薯的淀粉所得到的副产物, 或者加工大麦和豆等得到的副产物。

例如生产麦淀粉的副产物有利地用于生产 L-乳酸, 更特别是麦的溶解物 (wheat solubles), 或玉米淀粉生产得到的副产物, 更特别是玉米浆。

此处, 可更新的原料含有淀粉作为剩余葡萄糖或碳的来源, 和高分子量蛋白质、以及游离氨基酸和肽作为氮源。

但是, 尽管认为一些微生物能直接同化淀粉或高分子量的蛋白质, 以便其自身生长和生产经济可行的代谢物, 因为它们具有必要的酶催设备来降解它们, 但是其它微生物要求这样的条件, 其中对碳和氮源进行处理, 以使它们能被直接同化。

麦溶解物例如来自从在湿麦淀粉生产工艺中从淀粉分离得到的 B 麦淀粉的分离流。B 淀粉也称作第二淀粉, 基本上包括绝大部分比例的淀粉的小颗粒或受损颗粒, 并含有杂质例如戊糖、蛋白质和类脂。

在这些淀粉的水解产物中发现这些杂质, 其中一部分未被传统提纯和软化工艺所除去, 所以使得 B 淀粉不适合生产例如食品级右旋糖。这些种类的 B 淀粉所以难以在工业上应用。

申请人建议将 B 淀粉加热到至少 60℃ 的温度, 并用 α -淀粉酶和

葡糖淀粉酶处理 B 淀粉以便从其中释放出能发酵的糖，并任选地用能降解植物纤维的酶处理，选自半纤维素、果胶酶和木聚糖酶，如下所述。

对于直接从干物质含量为约 9-10%的玉米秣得到的玉米浆，作为玉米浆基本组分的 35-40 重量%的蛋白质的缺点是难以被同化。

申请人已显示这些蛋白质可以用选自碱性蛋白酶的解蛋白酶在使得这些蛋白质易于在随后的发酵步骤中进行代谢的 pH 和温度条件下处理。可以有利地使用在 pH 为 7、温度 60℃下，以 1%/干物质的速率处理约 6 小时的条件进行处理。

在本发明方法的第二个实施方案中，可更新的原料选自加工乳品、大麦、豆、糖甘蔗、制糖甜菜所得的副产品，独立地或组合使用。

例如，为了生产 L-乳酸，有利的是选择从加工乳品得到的副产物，更特别是乳清，以及从加工制糖甜菜得到的副产物，更特别是糖浆。

在这里，所用的可更新的原料含有能更容易地被大多数微生物直接同化的碳源。

因此，制糖甜菜糖浆例如基本上含有蔗糖作为能被微生物直接同化的碳源来生产乳酸。

以相同的方式，乳糖作为乳清的基本糖化组分容易地被同化。

但是，这些蛋白质难以被一些微生物同化。

在使用加工乳品的副产物制备乳酸的情况下，例如，所以可以有利地在用微生物处理之前对从含有乳糖的乳品得到的初始副产物进行蛋白分解作用。

蛋白分解步骤形成对微生物生产乳酸有活化作用的肽。

从含有乳糖的乳品得到的原料可以是例如中性或酸性乳清，乳清的超过滤渗透物，乳糖、乳糖结晶源液，这些原料还可以含有丝胶蛋白或酪蛋白。

可用于蛋白水解的蛋白酶选自胰酶、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、木瓜蛋白酶等。

根据所选择的可更新的原料，则必要的是从所述富含能被直接同

化的碳或氮源的原料除去高分子量的不溶性杂质。

不溶性杂质大多数是纤维。

例如，不溶物有利地从麦溶解物中分离出来，该麦溶解物已通过本领域熟练技术人员公知的技术被用于液化或糖化的酶处理，例如离心和微量过滤，单独或组合使用，如下所述。

本发明方法的作为其基本特征之一的第二个步骤，包括处理原料，以便从中除去大多数低分子量杂质，而不改变能被直接同化的碳源的浓度，其中使用选自纳米级过滤和电渗析的技术，单独或组合使用。

申请人所以已克服了这样的技术偏见，即必须在发酵结束时对乳酸生产培养基进行纳米级过滤和/或电渗析，而不是对发酵培养基本身在用微生物培植之前进行。

基于可更新的原料的发酵培养基含有许多“低分子量杂质”，即，在本发明的公开内容中指妨碍由所述发酵培养基生产的代谢物的随后纯化步骤的小分子。

小分子可以是例如不能被微生物同化的糖的残余物，例如 C5 糖，这些残余物污染了发酵培养基。

它们还可以是有机酸，例如外消旋 D-乳酸和 L-乳酸，其在生产作为经济可行的代谢物的乳酸情况下，阻碍顺利地回收光学纯的乳酸。

常规用于除去这些小分子的技术是本领域技术人员公知的，包括例如膜过滤技术，或传统的电渗析，适用于所述低分子量杂质的尺寸范围。

但是，熟练技术人员通常不采用以上技术方案来处理发酵培养基，因为分离界限还导致除去能被微生物直接同化的、尺寸在杂质尺寸范围内的碳源。

如上所述，所有以上技术实际上已用于发酵培养基，不仅仅是在发酵结束时。

申请人所以已显示，与文献中的常规方法相比，这些膜过滤技术和更特别的是纳米级过滤，或传统的渗析技术能清除低分子量杂质，并惊奇地和未预料到的是，能在不改变能被微生物同化的碳源的

含量的情况下进行过滤

由申请人进行的研究已确定了用于达到预期效果的上述技术的应用条件。

例如，为了从麦溶解物生产乳酸，申请人已显示通过使由本发明方法的前两个步骤制备的微量过滤液的干物质含量，对于纳米级过滤分离达到 2-10%，优选约 4%，如下所述，或对于电渗析处理达到 5-30% 的值，优选约 20%，这样可以保持所有碳源不受影响，并除去基本上全部 D-乳酸和 L-乳酸的外消旋混合物。

例如，为了从经碱性蛋白酶处理的玉米浆生产乳酸，如在本发明方法的第一步所述，进行处理以达到 1-16% 的干物质，优选约 2%，以及传统的电渗析处理，如在下面所述，也除去基本上所有 D-乳酸和 L-乳酸的外消旋混合物，而不会改变被直接同化的碳源的浓度。

本发明方法的第三步包括处理已除去低分子量杂质的原料，以补充能被微生物直接同化的碳或氮源。

已从中除去杂质的可更新原料的氮源例如可以在纳米级过滤步骤之后补充。

在麦溶解物的情况下，从纳米级过滤得到的保留物用 ALCALASE® 碱性蛋白酶（来自 NOVO）处理，以释放出肽。

在玉米浆的情况下，额外的碳源可以通过葡萄糖或通过根据本发明方法处理的可更新的原料来提供。

本发明的最后步骤包括将所转化的可更新的原料回收，并直接用作发酵培养基。

能被直接同化的碳和氮源的富集以及通过纳米级过滤膜或传统电渗析的便利分离技术进行不溶性杂质和低分子量杂质的清除，得到了完全适用于生产经济可行的代谢物的培养基，甚至用于生产已除去杂质的微生物群体。

在生产有机酸的特定情况下，更特别地是生产 L-乳酸，得到能满足药物纯度标准（“United States Pharmacopeia”的热稳定性测试）并符合“Food Chemicals Codex”标准的光学纯的乳酸，只需要不超

过有限数目的纯化步骤。

本发明的其它特征和优势将通过以下说明性和非限定性实施例表现出来。

实施例 1

将从“B”麦淀粉的分离流中得到的并具有 4%干物质的麦溶解物加热到 60℃ 15 小时，用 NOVO 的 TERMAMYL LC α -淀粉酶以 0.05%/干物质的速率和 GENENCOR 的 OPTIDEX L 300 A 糖化酶以 1%/干物质的速率处理，以释放出可发酵的糖。通过微量过滤法在 0.14 微米膜上除去不溶物。

所得的具有 3.3%干物质的滤液具有下表 I 所列的组成。

表 I

组分	重量%/干物质
葡萄糖	40
果糖	10
半纤维素	17
蛋白质	15
D-乳酸和 L-乳酸	10
盐和脂肪	8

然后将微量过滤的滤液在配备有 DL 2540 纳米级过滤膜的 2.5 米²EURODIA 实验组件上在约 20 巴压力下进行纳米级过滤；通过外部冷却将温度调节到 30℃。渗透物含有 0.3%干物质，并主要由 1 克/升的 D-乳酸和 L-乳酸以及约 1 克/升的 C5 糖（木糖和阿糖）组成。

保留物，在通过纳米级过滤浓缩 4.5 倍之后，含有 16%干物质，并具有下表 II 所列的组成。

表 II

组分	重量%/干物质
葡萄糖	43
果糖	10
半纤维素	20
蛋白质	18
D-乳酸和 L-乳酸	2
盐和脂肪	6

该步骤还从麦溶解物中显著清除了外消旋 D-乳酸和 L-乳酸。

半纤维素将在发酵结束时以生物量被除去，但其可有利地在纳米级过滤步骤之前用本领域熟练技术人员公知的内-和外-木聚糖酶进行水解。

纳米级过滤步骤之后，可以在以下条件下用蛋白酶处理，以释放出形成发酵培养基的能直接同化的碳源所必要的肽。所以在这种情况下，不加入来自外源的肽是必要的。

将 pH 调节至 7，温度调节到 60℃。来自 NOVO 的 ALCALASE®蛋白酶以 1%/干物质的速率加入，并在 60℃下培养 4 小时。

在用蛋白酶水解的步骤之后，该培养基通过加热到 120℃10 分钟来消毒，之后可以直接用作发酵培养基。

下表 III 列出了在可用容积为 15 升（其中含有 13 升具有 16%干物质的麦溶解物，处理的和未处理的）的发酵桶中得到的 D-乳酸和 L-乳酸的组成。

包括 7 小时预培植的乳酸乳球菌（*Lactococcus Lactis*）菌株的 1.5 升培养基用于接种这些发酵桶。

pH 值设定为 6.5，并用 12N 的 NH_4OH 调节。温度为 40℃。

表 III

纳米级过滤	ALCALASE®处理	发酵时间(小时)至 Glc=0	L-乳酸 (克/升)	D-乳酸 (克/升)
无	有	12	59	2.8
有	无	50	59	0.5
有	有	12	60	0.5

因此，对于通过纳米级过滤预处理的培养基，发酵培养基的最终组成只显示痕量的 D-乳酸。

所以，如上处理的麦溶解物能确保有效地发酵成 L-乳酸，且没有显著量的能妨碍随后纯化的杂质。

当用 2.4 升 ALCALASE®预处理培养基时，得到较高的产率。

实施例 2

将从“B”麦淀粉的分离流中得到的并具有 20%干物质的麦溶解物加热到 60℃ 12 小时，用 NOVO 的 TERMAMYL LC α -淀粉酶以 0.05%/干物质的速率，GENENCOR 的 OPTIDEX L 300 A 糖化酶以 1%/干物质的速率和 GENENCOR 的 SPEZYME CP 半纤维素以 0.5%/干物质的速率处理，以释放出可发酵的糖。通过微量过滤法在 0.14 微米膜上除去不溶物。

所得的具有 16%干物质的滤液具有下表 IV 所列的组成。

表 IV

组分	重量%/干物质
葡萄糖	55.4
果糖	8.5
半纤维素	11
蛋白质	6.4
D-乳酸和 L-乳酸	3.8
盐和脂肪	6.3

然后将微量过滤液在配备有 CMX-S 阳离子或 AMX SB 阴离子交换膜的活性表面积为 5.6 米²的 EUR6B EURODIA 电渗析组件（NEOSEPTA-TOKUYAMA SODA）上按照产品说明书进行传统的电渗析处理，生成被稀释到 13.6%干物质并具有下表 V 组成的级分。

表 V

组分	重量%/干物质
总糖	90.5
水解的蛋白质	7.5
D-乳酸和 L-乳酸	1.5
盐和其它组分	0.5

该步骤还显著除去了被麦溶解物引入的外消旋 D-乳酸和 L-乳酸。

在该电渗析步骤之后，可以在以下条件下进行蛋白酶处理，以释放出形成发酵培养基的能直接同化的碳源所必要的肽。

所以在这种情况下，不加入来自外源的肽是必要的。将 pH 调节至 7，温度调节到 60℃。加入 2.4 升 NOVO 的 1%/干物质的 ALCALASE®，并在 60℃ 下培养 4 小时。

在用蛋白酶水解的步骤之后，该培养基通过加热到 120℃ 10 分钟来消毒，之后可以直接用作发酵培养基。

下表 VI 列出了在可用容积为 15 升（其中含有 13 升具有 15% 干物质的麦溶解物，处理的和未处理的）的发酵桶中得到的 D-乳酸和 L-乳酸的组成。包括 7 小时预培植的乳酸乳球菌菌株的 1.5 升培养基用于接种这些发酵桶。pH 值设定为 6.5，并用 12N 的 NH₄OH 调节。温度为 40℃。

表 VI

电渗析	ALCALASE®处理	发酵时间（小时）至 Glc=0	L-乳酸（克/升）	D-乳酸（克/升）
无	有	18	80	2.2
有	有	22	80	0.8

因此，对于通过电渗析处理的培养基，发酵培养基的最终组成只显示痕量的 D-乳酸。

所以，如上处理的麦溶解物能确保有效地发酵成 L-乳酸，且没有显著量的能妨碍随后纯化步骤的杂质。

实施例 3

从中间体玉米糝中得到的并具有 3.3% 干物质的玉米浆具有下表 VII 所列的组成。

表 VII

组分	重量%/干物质
总糖	3
蛋白质	38
D-乳酸和 L-乳酸	32
盐和其它组分	27

因为玉米蛋白质难以同化,所以在 pH 为 7 和 60℃ 下用 1%/干物质的 NOVO 公司的 ALCALASE®预处理 6 小时。

然后将由此得到的水解产物在配备有 CMX-S 阳离子或 AMX SB 阴离子交换膜的活性表面积为 5.6 米²的 EURODIA EUR6B 电渗析组件 (NEOSEPTA-TOKUYAMA SODA) 上按照产品说明书进行传统的电渗析处理,生成被稀释到 2%干物质并具有下表 VIII 组成的级分。

表 VIII

组分	重量%/干物质
总糖	4
水解的蛋白质	51
D-乳酸和 L-乳酸	3
盐和其它组分	42

用 ALCALASE®进行预处理,并通过传统电渗析除去氨基酸,提供了在开始发酵时水解度为 44 的玉米蛋白水解产物,这由胺化氮与总氮量的比例确定,而未处理液体的水解度为 36。

下表 IX 列出了在可用容积为 15 升(其中含有 8.8 升具有 2%干物质的麦溶解物,处理的和未处理的)的发酵桶中得到的 D-乳酸和 L-乳酸的组成,向其中加入 60 克/升葡萄糖作为能被直接同化的碳源。

包括 7 小时预培植的乳酸乳球菌菌株的 1.5 升培养基用于接种这些发酵桶。

pH 值设定为 6.5,并用 12N 的 NH₄OH 调节。温度为 40℃。

表 IX

电渗析	ALCALASE®处理	发酵时间(小时)至 Glc=0	L-乳酸 (克/升)	D-乳酸 (克/升)
无	无	18	62	3.3
有	无	18	59	0.2
有	有	15	59	0.2

所以,通过电渗析预处理的玉米浆能确保有效地发酵成乳酸,且没有显著量的能妨碍随后纯化步骤的杂质。通过用 ALCALASE®预处理

发酵培养基再次提高了产率。

实施例 4

浓缩的制糖甜菜糖浆，再次稀释到 10%干物质，通过传统的电渗析在与实施例 2 相同的条件下处理。

在电渗析之前，产品的干物质的组成列于下表 X 中。

表 X

组分	重量%/干物质
糖（蔗糖）	66（95）
蛋白质	14
灰分	12
有机酸	4
其它组分（包括甜菜碱）	4

电渗析步骤制得具有 5.3%干物质的溶液，其中糖的含量大于 70%，蛋白质含量为约 16%。

由此从发酵培养基中除去了大于 90%的不需要的有机酸。

实施例 5

在与实施例 4 相同的条件下，浓缩的制糖甜菜糖浆，再次稀释到 20%干物质，在微量过滤之后通过传统的电渗析在与实施例 2 相同的条件下进行处理。

在电渗析之前，产品的干物质的组成列于下表 XI 中。

表 XI

组分	重量%/干物质
糖（蔗糖）	65.4（95）
蛋白质	11.7
灰分	12.3
有机酸	4.4
其它组分（包括甜菜碱）	6.2

在这种情况下，电渗析步骤制得具有 16.5%干物质的溶液，其中

糖的含量大于 70%，蛋白质含量为约 11%。

由此从发酵培养基中除去了大于 90%的不需要的有机酸。

制备了发酵培养基，其含有 80 克/升的糖浆、5 克/升的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、2 克/升的 KH_2PO_4 和 0.5 克/升的 MgSO_4 ，其中糖浆通过上述方式进行电渗析（培养基 B），或不经过电渗析（培养基 A）。

这些生产培养基用 10% baker 酵母（酿酒酵母，*S. Cerevisiae*）接种，得自在含有 50 克/升葡萄糖和 5 克/升酵母抽提物的培养基中预培植 24 小时。

用 1N NaOH 将 pH 调节到 5，温度是 30℃，生物量的生成在可用容积为 15 升的反应器中在 600rpm 搅拌下和 1vvm 通风下进行 17 小时。

下表 XII 和 XIII 列出了在制备培养基 A 和 B 中分别生产酿酒酵母的结果。

表 XII

时间	培养基 A						
	生物量	蔗糖	葡萄糖+ 果糖	EtOH	K	NH ₄	PO ₄
(小时)	(克/升)	(克/升)	(克/升)	(克/升)	(克/升)	(克/升)	(克/升)
0	0.3	59	3.5	1.8	4.9	1.4	2.2
2	0.6	54.4	3	2.3	Nd*	Nd	Nd
4	1	52.1	4	3	Nd	Nd	Nd
6	1.5	38.5	9.9	4.8	Nd	Nd	Nd
8	2.4	24	15	6.9	Nd	Nd	Nd
14	6.8	0	0	18.5	6.4	0.9	2
17	7.4	0	0	16	Nd	Nd	Nd

*Nd=未测

表 XIII

	培养基 B						
时间	生物量	蔗糖	葡萄糖+ 果糖	EtOH	K	NH ₄	PO ₄
(小时)	(克/升)	(克/升)	(克/升)	(克/升)	(克/升)	(克/升)	(克/升)
0	0.3	63.2	0	1.8	1.2	1.3	1.3
2	0.6	60.5	0	2	Nd	Nd	Nd
4	1	57.9	0	2.8	Nd	Nd	Nd
6	1.8	46.5	4	4.4	Nd	Nd	Nd
8	3.1	33.7	9.9	7.1	Nd	Nd	Nd
14	9.6	0	0	18.5	4	0.5	0.8
17	11	0	0	17.5	Nd	Nd	Nd

从这些结果可见, 在糖浆经过电渗析的培养基中, 生长的初始速率是 0.29 小时⁻¹, 生物量产率是 24%, 而如果使用未电渗析的糖浆, 生长的初始速率仅仅是 0.26 小时⁻¹, 生物量产率是 17%。

所以可见, 根据本发明方法对糖浆的处理非常适用于有效地生产酵母。

实施例 6

乳清通过传统的电渗析在与实施例 2 相同的条件下进行处理。

具有 6.6%干物质的乳清的初始组成列于下表 XIV 中。

表 XIV

组分	重量%
糖	71
蛋白质	12
有机酸	4
盐	9
脂肪	4

传统电渗析步骤制得具有 4.3%干物质的溶液。

糖的含量大于 80%, 蛋白质含量为约 14%。

所有污染性的有机酸被从培养基中除去。

实施例 7

乳清通过传统的电渗析在与实施例 6 相同的条件下进行处理。

在这种情况下，初始乳清组成是 16.2% 干物质，列于下表 XV 中。

表 XV

组分	重量%/干物质
糖	69.2
蛋白质	11
有机酸	3.6
盐	14.6
脂肪	1.6

传统电渗析步骤制得具有 14.6% 干物质的溶液。糖的含量大于 80%，蛋白质含量为约 9%。所有污染性的有机酸被从培养基中除去。

以上述方式电渗析的乳清在以下条件下引入生物量生产培养基中，即乳酸酵素（乳链球菌 *streptococcus lactis*）和酵母酵素（酿酒酵母）。

从在陪替氏培养皿中培养的群体中取出等 “ose” 当量的细胞，加入 2 升 Erlenmeyer 烧瓶中，其中含有 500 毫升生产培养基，由 80 克/升在 150rpm 搅拌下电渗析或未电渗析（对比）的乳清组成，对于酿酒酵母在需氧条件下温度为 30℃，对于乳链球菌在厌氧条件下温度为 40℃。

生物量的富集通过监测细胞数目来确定。

表 XVI 显示在培养 24 小时后得到的结果。

表 XVI

	乳链球菌	酿酒酵母
经微量过滤的乳清	0	1.7×10^8
经微量过滤和电渗析的乳清	1.7×10^8	2.7×10^8

所以，根据本发明通过电渗析进行处理对于所测试的两种菌株的培养十分有效。在传统酵母的情况下，经电渗析的培养培养基制得基本上两倍的生物量，而在乳酸酵素的情况下，经微量过滤的乳清甚至含有能被电渗析清除的生长抑制剂。