



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 97181922. X

[45] 授权公告日 2003 年 1 月 1 日

[11] 授权公告号 CN 1097635C

[22] 申请日 1997. 12. 22 [21] 申请号 97181922. X

[30] 优先权

[32] 1996. 12. 23 [33] DK [31] 1496/96

[86] 国际申请 PCT/DK97/00596 1997. 12. 22

[87] 国际公布 WO98/28433 英 1998. 7. 2

[85] 进入国家阶段日期 1999. 8. 23

[73] 专利权人 拉克塔斯坎有限公司

地址 丹麦奥登斯

[72] 发明人 B·诺尔达尔

[56] 参考文献

CN1108304 1995. 9. 13 C12P7/56

EP393818 1990. 10. 24 C07C51/47

US4698303 1987. 10. 6 A23C21/02

US5503750 1996. 4. 2 C12P7/56

WO964121 1996. 12. 19 B01D9/02

审查员 谢 妍

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 罗 宏 王其灏

权利要求书 2 页 说明书 7 页

[54] 发明名称 乳酸的发酵生产和分离

[57] 摘要

通过形成乳酸的细菌从发酵罐中的含糖发酵液体发酵乳酸的方法,其中存在乳清蛋白,在其中或作为乳酸形成细菌的营养底物加入乳清蛋白,其中在发酵过程中,在发酵罐中至少加入一种蛋白酶,以致蛋白质到氨基酸的水解过程与糖发酵成有机酸的过程同时发生,并且其中从发酵液体分离来自发酵的乳酸。优选地加入氨产生乳酸铵,并且通过包括超滤,离子交换,常规电透析和利用双极性膜电透析的方法优选地分离乳酸。

权 利 要 求 书

1. 借助乳酸形成细菌在发酵罐中从含糖发酵液体发酵乳酸的方法,其中存在乳清蛋白,或将乳清蛋白加入,作为乳酸形成细菌的营养底物,该方法包括在发酵过程中在发酵罐中加入至少一种蛋白质水解酶,以致蛋白质到氨基酸的水解与糖成为有机酸的发酵同时发生,并且利用超滤步骤及随后至少两个电透析步骤进行分离,从发酵物得到乳酸。
2. 根据权利要求1的方法,其中通过向发酵液体加入氨以在基本恒定的水平维持发酵液体的pH,从而在发酵液体中形成乳酸铵。
3. 根据权利要求1或2所述的方法,其中利用具有阻止所述蛋白质水解酶和非水解蛋白质通过的截断值的过滤器进行超滤。
4. 根据权利要求3所述的方法,其中过滤器具有的截断值不大于10,000道尔顿。
5. 根据权利要求4所述的方法,其中过滤器具有的截断值是5000道尔顿。
6. 根据权利要求1-5的任何一个所述的方法,其中乳酸的分离进一步包括在超滤之后的离子交换步骤以便除去钙和镁离子。
7. 根据权利要求6所述的方法,其中离子交换步骤利用了首先结合二价离子的螯合树脂。
8. 根据权利要求1所述的方法,其中电透析包括第一个和第二个电透析步骤,其中第二个电透析步骤通过双极性膜进行。
9. 根据权利要求1-8的任何一个所述的方法,其中乳酸的分离进一步包括在第二个电透析步骤后的利用强阳离子交换器的离子交换步骤和利用弱阴离子交换器的离子交换步骤。
10. 根据权利要求1-8的任何一个所述的方法,其中乳酸的分离进一步包括在第二个电透析步骤之后,第三个电透析步骤,其中调节含乳酸的溶液的pH到范围为1.5到2.5的值。
11. 根据权利要求1所述的方法,其中发酵液体含有乳酸铵,并且其中乳酸通过下面步骤分离:
 - 将发酵液体进行超滤步骤得到含有乳酸铵的无多聚物的渗透物,

- 将超滤的产物进行利用螯合树脂的离子交换以便除去钙和镁离子,

- 将离子交换的产物进行第一个电透析和第二个电透析以便转换乳酸铵成为乳酸和氢氧化铵, 其中第二个电透析步骤利用双极性膜进行,

5

- 将第二个透析的含乳酸的产物进行(1)利用强阳离子交换器的离子交换, 和利用弱阴离子交换器的离子交换或(2)第三个电透析步骤, 其中含乳酸的溶液的 pH 调节到 1.5-2.5 的范围, 并且

- 浓缩得到的乳酸成需要的浓度。

说明书

乳酸的发酵生产和分离

发明领域

5 本发明涉及发酵生产乳酸和从含乳酸的溶液分离乳酸的方法。

发明背景

欧洲专利号 230.021 叙述了连续发酵葡萄糖生成乳酸，然后通过电透析从溶液提取乳酸的方法，其中通过以同样于它形成的速度除去乳酸，控制发酵罐中的 pH，发酵罐的内容物在电透析单元中再循环。
10 将酵母提取物和无机盐用作营养。这一系统的缺点是已知发酵罐液体中的细菌吸收到电透析的膜上，引起电透析单元中的电阻增加，导致极大增加了电透析过程的动力消耗。

Boyaval 等人(生物技术通讯, 第 9 卷, 第 3 册, 207 - 212, 1987)叙述了利用三阶段发酵过程的乳酸发酵反应器, 该过程包括在第一时期
15 期生产生物量和乳酸, 在第二阶段通过超滤分离和浓缩细胞, 在第三阶段通过电透析浓缩乳酸和纯化。但是, 据报道, 这一系统显示了超滤膜的阻塞导致渗透流速的大幅度限制的缺点。

美国专利号 4, 110175 也叙述了电解纯化有机酸包括乳酸的常用方法。在美国专利号 5, 002, 881 中叙述了这一方法的改进的版本,
20 其中通过发酵含葡萄糖的培养基作为乳酸铵形成乳酸, 这使利用超滤从发酵液体中分离乳酸铵成为可能, 因为来自超滤的滞留物回到了发酵罐。在这种方法中, 在随后的电透析过程中没有细菌吸收到膜上, 所以, 动力消耗就低了。用于这一专利的微生物是凝结芽胞杆菌, 该细菌具有的特性是不需要含有酵母提取物或玉米浆的特殊营养培养
25 基, 而这些营养已知是当利用乳酸细菌时维持乳酸发酵所必需的。在电透析之前, 通过反渗透 (RO) 浓缩发酵罐液体, 并且随后在电透析单元中处理浓缩的液体, 其中通过单独操作中的双极性膜从乳酸铵形成乳酸。在这一操作中, 在同一时间形成了氢氧化铵, 并且可以作为中和乳酸的介质回到发酵罐。但是, 在这一过程中, 利用氨基酸作为发
30 酵细菌的营养, 导致的缺点是耗价相对高。另外的缺点是用于浓缩的 RO 将导致非转化的有机物质(残留的葡萄糖和氨基酸)包括在利用双极性膜 (bipolar membrane) 的电透析处理中, 这样它们降低了该方

法的效率。同样，得到的产物可能不是热稳定的，因为在乳酸中存在残留的糖。

美国专利号，4, 698, 303 叙述了从乳清蛋白形成氨基酸和在乳清中乳糖的发酵中将乳清蛋白作为营养的用途。但是，美国 4, 698, 303 具有的缺点是需要从乳清蛋白独立水解生产氨基酸，进行的水解作为独立的酸酶解过程，然后将水解产物作为营养进料到膜发酵罐中。

US5, 503, 750 公开了利用超滤(UF)，纳过滤(NF)和逆渗透(RO)生产和回收乳酸的方法。

W096/41021 公开了回收和纯化有机酸的方法，例如利用电透析回收纯化乳酸，其中利用螯合剂纳过滤和接触用于减少用于电透析的离子选择膜的堵塞。

EP0393818 - A 公开了利用电透析步骤，二极电透析步骤，利用强阳离子交换树脂处理和利用弱离子交换树脂处理纯化乳酸的方法。

本发明的简要公开

本发明的目的是提供以简单和廉价的方法生产和分离乳酸的方法，以便克服上面的过去的的方法的缺点。

因此，本发明的一个方面涉及通过乳酸形成细菌从发酵罐中的含糖发酵液体发酵乳酸的方法，其中存在乳清蛋白，或将乳清蛋白作为乳酸形成细菌的营养底物加入其中，该方法包括在发酵过程中，至少加入一种水解蛋白质的酶到发酵罐中，以致蛋白质到氨基酸的水解与糖发酵成有机酸同时发生，并且分离发酵形成的乳酸。

本发明的详细说明

根据本发明，通过生产乳酸的细菌培养物，在发酵罐中，将含有含糖溶液和乳清蛋白，例如来自乳清蛋白浓缩物的生产的乳清渗透物以及蛋白质水解酶，下面称为蛋白酶，的混合物的无菌生长培养基进行连续的发酵。

根据本发明，在利用的含糖溶液中的“糖”可以是任何用于乳酸发酵的适当的糖，例如单糖，如葡萄糖，果糖，或半乳糖，二糖，如蔗糖，麦芽糖，纤维二糖，或乳糖，或多糖。当然，可以利用不同的糖的混合物。糖可以适当地来源于例如乳清渗透物，但也可以来源于任何其它来源。

在优选的实施方案中，通过加入与乳酸形成可溶于水的盐，的氨，通常是氨气形式，在约 pH5-7 的范围内，发酵液体中的 pH 基本保持恒定。虽然通过其它碱，例如 NaOH, Ca(OH)₂, 或 CaCO₃, 维持需要的 pH 值是可能的，但这是较不优选的，其中有几个原因，在这些原因中，

5 有发酵液体中不期望钙离子的事实，和氨比碱如 NaOH 更加廉价的事实。另外，利用氨作为碱的优点是它提供了乳酸细菌需要的氮源，已

经发现这导致细菌的生长比例如 NaOH 导致的生长更加良好。

5 在另一个优选的实施方案中，将发酵液体进行超滤过程，该过程保留了含有细菌培养物和未水解乳清蛋白的滞留物，并且允许溶解的物质通过，包括发酵过程中形成的乳酸。当氨作为如上所述的碱加入时，乳酸可以例如是乳酸铵形式。

10 然后，在离子交换单元中，优选地利用首先结合二价离子的螯合树脂，优选地处理来自超滤过程的渗透物，以致利用钠离子替代渗透物中存在的钙和镁离子以及可能的铁离子，因此，防止了盐的沉淀，例如钙盐如磷酸钙，这种盐可能在随后的渗透物的电透析处理中导致膜的慢慢的不可逆的剥落。另外，除去铁离子导致最后的乳酸产物无色。

然后，在电透析过程中，优选地 2-步电透析过程，其中第一步利用了常规的电透析膜，优选地用来浓缩来自离子交换操作的得到的洗脱物。

15 随后，优选地将浓缩物进行第二个电透析过程，其中双极性膜将盐分离形成乳酸，无机酸和氢氧化铵溶液。因此，在同样于美国专利号 5, 002, 881 中叙述的两个独立的流，碱流和酸流中，乳酸铵转化成氢氧化铵和乳酸。但是，本发明代表的是简化的过程，因为在本发明中的进料流没有含有可能堵塞二极电透析膜的有机物质。存在的无机盐也是在这一步骤中分开的，阳离子作为氢氧化物在碱流中，阴离子在酸流中。

这一二步电透析过程的优点是在第一电透析步骤中除去的有机组成如残留的糖和氨基酸将不干扰后面的第二个(二极)电透析步骤，在第二个步骤中，乳酸铵转化成乳酸。

25 通常，将含有氢氧化铵的溶液以调节 pH 到设定的值，例如 pH 范围约 5.0-7.0，优选地，约 5.5-6.5，更优选地约 5.5-6.0 的量回流到反应器。优选地，将酸溶液导入强阳离子交换剂，其中利用氢离子交换阳离子。然后，在弱阴离子的离子交换剂中，以吸收乳酸的氢氧化物形式，优选地处理来自阳离子交换操作的洗脱物。然后，例如利用 0.5 摩尔/升的磷酸洗脱吸收的乳酸，磷酸只洗脱浓缩和非常纯化形式的乳酸和易挥发的脂肪有机酸，而其它阴离子保留在阴离子交换柱中。

5 作为如上所述的离子交换过程的替代，可以将酸溶液导入第三个电透析阶段。在这种情况下，利用，例如甲酸将酸溶液的 pH 值调节到约 1.5 到约 2.5，优选地，约 2.0 到约 2.2，以便从无机酸分离乳酸。这一强酸溶液的电透析使得乳酸从带电的无机酸分离，并且在稀释的流中与大多数甲酸和小量的乙酸一起回收。

10 虽然，根据本发明分离乳酸的过程优选地含有上面叙述的步骤的联合，即，超滤，利用螯合树脂的离子交换，第一个电透析，第二个电透析，和阳离子和阴离子交换或第三个透析，和并且优选地如上所述顺序，但是，本领域技术人员将理解的是在这一过程中的一个或多个步骤，如果需要或有利的話，可以在一定的情况中减去，并且/或者这些步骤的顺序可以某些情况下改变。

最后，将乳酸纯化和浓缩到需要的浓度，例如利用降膜式多时期真空蒸发器。可选地，通过其它已知的方法，例如，在压缩式蒸发器中进行乳酸的浓缩，其中将甲酸和乙酸与水一起蒸发掉。

15 本发明利用了乳清蛋白，乳清蛋白可以通过任何适当的蛋白酶水解成氨基酸以便提供发酵的营养。许多这样的蛋白酶是市场可得的，其中的一个例子是 Flavourzyme[®]，从 Novo Norkisk A/S，丹麦可以得到。作为乳酸形成细菌，可以利用任何适当的乳酸形成细菌，或不止一个乳酸细菌的联合，例如乳杆菌属，如瑞士乳杆菌，德氏乳杆菌，干酪乳杆菌，嗜酸乳杆菌，或德氏乳杆菌保加利亚种。乳酸形成细菌如乳杆菌属的各种可以单个利用或与另一个微生物一起利用，例如作为与例如唾液链球菌嗜热亚种的共培养物。

20 不同乳酸细菌如瑞士乳杆菌的不同菌株的用途使形成 L(+), L(-), 或 D(-) 以及 L(+)/(-) 和 D(-) 的混合物成为可能。在下面，术语“乳酸”打算指这些类型的乳酸或其混合物的任何一种。

根据本发明，在发酵罐中直接加入酶，而不需要其它安排，如降低 pH，降低 pH 是美国 4, 698, 303 中叙述的过程所必需的。

30 作为本发明人发现的结果，直接在发酵罐中加入蛋白水解酶而没有任何不利影响是可能的，发酵和水解可以发生在同一容器中，即发酵罐中，这产生比美国 4, 698, 303 公开的更加简单和更加廉价的方

法。另外，当利用本发明时，保持了美国 4, 698, 303 中公开的方法的优点。特定地，超滤膜可与发酵罐偶联，而没有被蛋白质阻塞，因为水解作用利用了直接加入到发酵罐中的酶，这一加入过程如此快以致在任何真正的蛋白质储存可能发生之前，蛋白质就水解成肽和氨基酸了。

5 利用在发酵罐中直接加入酶的另外的优点是它使利用非常小孔大小例如，不大于约 10, 000 道尔顿和优选地更低的超滤器成为可能。因此，维持截断值例如约 5000 道尔顿的超滤器恒定的高流量是可能的，以致发酵产物乳酸的纯化可以简化，因为在来自偶联发酵罐的超
10 滤器的渗透物中的更高级的多聚物成分(主要是乳酸细菌产生的未水解的蛋白质，葡聚糖和其它多糖)的含量比其它已知的系统要低。最后，超滤结合发酵的用途意味着加入的酶将保留在发酵罐中，它们不能通过膜，所以酶的作用的持久性更长，这使酶的消耗比其它乳酸发酵系统极大地节省成为可能。

15 本发明将进一步在下面的非限制性的实施例中说明。

实施例

在利用 Koch S4-HFK-131 螺旋通风的膜的 100 升膜反应器中进行乳酸发酵。超滤膜的截断值是 5 千道尔顿，并且膜的总面积是 7.3 平
20 方米。在膜中的入口和出口压分别是 4.4 和 2.9 巴。

在甜乳清，乳清蛋白浓缩物和其它营养的基础上，制成 90 升水溶液生长培养基，培养基的组成如下：

25	9.5%重量的乳清蛋白
	4.0%重量的乳糖
	1.5%重量的酵母提取物
	0.3%重量的 K_2HPO_4
	0.04%重量的 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$
	0.015%重量的 $MnSO_4 \cdot 4H_2O$
30	0.1%重量的吐温 80
	0.006%重量的盐酸半胱氨酸

将培养基加热到 70℃，45 分钟，并且冷却到发酵温度 45℃。加入 18 克冷冻干燥瑞士乳杆菌培养物和 53 克 Flavourzyme[®]酶。在厌氧条件成批进行发酵 9 小时。然后，开始进行连续的发酵。水状进料培养基是基于乳清渗透物并且具有下面的组合物：

5

-
- 0.35%重量的乳清蛋白
 - 0.01%重量的 Flavourzyme[®]
 - 4.0%重量的乳糖
-

10 利用氨气调节反应器中的 pH 到 5.75。

通过反应器内容物的连续流出将生物量的浓度保持在约 7-8%。在这一生物量浓度，在超滤器上渗透的流量在发酵过程中是恒定的，并且约为 1 升/分钟(8.2 升/(平方米 × 小时)。在 34 天的连续的发酵过程中，未在超滤器上进行原位清除 (cleaning-in-place)。

15 发酵罐中的稀释速度(D)在 0.15 和 0.3/小时之间变化。这对转化产量没有影响，转化产量在 34 天发酵过程中是恒定的 99.5%或更多。在超滤渗透物中乳酸浓度为 4.0%，在 D = 0.3/小时的生产率是 12 克/升.小时)。

20 在超滤后，乳酸的进一步分离如上所述进行，即利用带有螯合树脂的离子交换，第一个电透析，第二个电透析，和阳离子和阴离子交换的联合。乳酸的整个回收率是非常高的，约为基于加入到发酵罐的糖的量的 85-90%。