[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C12P 7/56 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)

[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 98810123.8

[45] 授权公告日 2009 年 3 月 11 日

[11] 授权公告号 CN 100467608C

[22] 申请日 1998.10.13 [21] 申请号 98810123.8
[30] 优先权
[32] 1997.10.14 [33] US [31] 08/949,420
[86] 国际申请 PCT/US1998/021542 1998.10.13
[87] 国际公布 WO1999/019503 英 1999.4.22
[85] 进入国家阶段日期 2000.4.13
[73] 专利权人 卡吉尔公司
地址 美国明尼苏达
[72] 发明人 T·L·卡尔森 E·M·小彼得斯
[56] 参考文献
GB2251864A 1992.7.22
US4769329 1988.9.6
审查员 谢 妍

[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 郭建新

权利要求书 2 页 说明书 34 页 附图 6 页

[54] 发明名称

低 pH 乳酸发酵

[57] 摘要

提供了一种用于生产乳酸的方法，它包括在营养培养基中培养耐酸的乳酸或乳酸盐生产微生物，例如耐酸的纯乳酸细菌，以生产含有高浓度游离乳酸的发酵液。 还提供了能够生产高浓度游离乳酸的分离的耐酸纯乳酸细菌。

1. 一种用于生产乳酸的方法，它包括:

在营养培养基中在不高于4.2的平均培养pH下培养耐酸的乳酸或乳酸盐生产微生物，以便在不高于4.2的最终培养pH下产生含有至少50g/L的乳酸或乳酸盐的溶液，其中所述乳酸或乳酸盐具有至少50%的光学纯度。

2. 权利要求1的方法，其中所述耐酸的乳酸或乳酸盐生产微生物是耐酸的纯乳酸细菌。

3. 权利要求1的方法，其中所述耐酸的乳酸或乳酸盐生产微生物是耐酸的纯乳酸乳杆菌。

4. 权利要求1－3任一项的方法，其中在至少43℃的温度下进行培养。

5. 权利要求4的方法，其中在45℃－52℃的温度下进行培养。

6. 权利要求5的方法，其中在47℃－50℃的温度下进行培养。

7. 权利要求1－3任一项的方法，其中所述营养培养基含有至少15g/L的玉米浸渍液干固体。

8. 权利要求1－3任一项的方法，其中所述营养培养基含有至少50g/L的碳水化合物，所述碳水化合物包括葡萄糖、果糖、半乳糖、蜜二糖、蔗糖、棉子糖、水苏糖或它们的混合物。

9. 权利要求1－3任一项的方法，其中所述营养培养基含有碱。

10. 权利要求 9 的方法，其中所述碱包括碳酸钙、氢氧化钠、氢氧化铵、碳酸氢钠或它们的混合物。

11. 权利要求 1－3 任一项的方法，其中所述营养培养基含有乳酸盐。

12. 权利要求 11 的方法，其中所述乳酸盐包括乳酸钙、乳酸钠、乳酸铵或它们的混合物。

13. 权利要求 2 或 3 的方法，其中所述平均培养 pH 不高于 4.0，以产生含有至少 75g/L L－乳酸或乳酸盐的溶液。

14. 权利要求 2 或 3 的方法，它包括在所述营养培养基中培养所述细菌以产生光学纯度为至少 80％的 L-乳酸或乳酸盐。

15. 权利要求 2 或 3 的方法，它包括在所述营养培养基中培养所述细菌以便以至少 2.0g/L/hr 的总速率产生乳酸或乳酸盐。

16. 权利要求 2 或 3 的方法，它包括在所述营养培养基中培养所述耐酸的纯乳酸细菌，以便在不高于 3.9 的最终培养 pH 下产生一种溶液，该溶液含有至少 75g/L L-乳酸或乳酸盐或至少 75g/L D-乳酸或乳酸盐。

低pH乳酸发酵

长期以来，乳酸及其盐类在化学、化妆品、食品和医药工业中被广泛地应用。最近，基于乳酸或乳酸盐的新的生物工程材料，例如可生物降解的丙交酯聚合物，已经使得对乳酸或乳酸盐、尤其是对 L-或 D-乳酸或乳酸盐的游离酸形式的需求增加了。在生产各种工业聚合物时使用乳酸已经被描述于美国专利中，例如：5,142,023；5,247,058；5,258,488；5,357,035；5,338,822；5,446,123；5,539,081；5,525,706；5,475,080；5,359,026；5,484,881；5,585,191；5,536,807；5,247,059；5,274,073；5,510,526；以及5,594,059。

尽管化学方法可以用来生产乳酸，但石化原料日益上涨的费用以及解析由传统化学方法生产的外消旋乳酸或乳酸盐混合物的需求，使发酵法成为一种有吸引力的可选方法来生产富含乳酸或乳酸盐的一种旋光异构体的乳酸或乳酸盐。用于生产可生物降解的丙交酯聚合物的方法通常需要 L-或 D-乳酸或乳酸盐的游离酸形式作为起始原料。不幸的是，对于大多数有机酸发酵来说，由有机酸（在本例中是乳酸）引起的终产物抑制会成为有效发酵的一个主要障碍。除乳酸或乳酸盐浓度外，通常用于乳酸或乳酸盐发酵的细菌菌株还会受到低 pH 的抑制。为了克服这一问题，工业乳酸或乳酸盐发酵过程通常在较高的 pH 下操作，例如至少大约 5.0，通常等于或高于约 6.0。这导致所生产的乳酸或乳酸盐产品基本上都以一种盐的形式存在。通常需要附加的处理步骤以除去阳离子性的平衡离子并分离出所需要的游离乳酸。另外，由于高浓度的某些盐类－例如钠阳离子－会对发酵有抑制作用，所以所存在的盐的种类和／或数量也能够对发酵的效率产生影响。

使用食淀粉乳杆菌（*lactobacillus amylovorus*），由酶解稀释的玉米淀粉生产外消旋乳酸或乳酸盐已经被报道过。Cheng 等人，J. Ind. Microbiol.，7:27-34(1991)。尽管在 pH 低至 4.2 时较高的生产

水平已经被报道过，但该发酵没有提供富含任何一种旋光异构体的乳酸或乳酸盐。

用于改进乳酸或乳酸盐发酵效率的许多方法已经被报道过。这些方法中的数种都涉及在连续的基础上将游离乳酸从发酵液中除去。例如，电渗析已经被用于通过将乳酸或乳酸盐从发酵液中除去来减少终产物抑制。高的渗析膜费用以及低的乳酸或乳酸盐梯度从总体上降低了这种方法的吸引力。离子交换以及使用聚乙烯基吡啶（polyvinylpyridine）从发酵培养基中除去乳酸或乳酸盐也曾经被报道过。而最近所描述的另一种方法涉及一个多级的萃取过程。该方法涉及用一种叔胺从发酵液中萃取乳酸或乳酸盐，目的是防止发酵液的 pH 值降低至抑制进一步乳酸或乳酸盐发酵的程度。但是，所报道的通过这种方法获得的乳酸或乳酸盐生产水平仍然相当低。使用这种方法还可能需要使萃取后的发酵液再经历一次二级萃取，从而在将萃取后的发酵液循环回发酵反应中之前，至少减少萃取剂叔胺的残余浓度。

美国专利 No.4,769,329（Cooper 等人）公开了一种在 4 和 6 之间的 pH 下、通过使用乳杆菌的发酵来制备旋光纯的 D-或 L-乳酸的方法。然而，Cooper 等人没有公开在低 pH 下的高产量。

JP 87 44 118 公开了在 4.5 和 7.0 之间的 pH 以 101 g/L 的浓度生产旋光性的乳酸。

JP 92 271 787 公开了一种在 8.0 的 pH 下、在含有 1,2-丙二醇的培养基中通过培养 I-生产假单胞菌（*Psuedomonas*）来生产 D-乳酸的方法。发酵完成后，用硫酸把培养物酸化至 pH 2.0 而获得 21 g/L 的 D-乳酸。

EP 0 308 064 公开了一种通过用乳杆菌发酵蕃茄饮料制备的改进的蕃茄饮料。在 EP 0 308 064 中没有讨论过按这种发酵方式获得的乳酸的产率或光学纯度。

GB 2 251 864 公开了一种低温稳定的乳杆菌的耐酸菌株，该菌株通过在从 3.4 至 4.2 的 pH 下、在含有牛奶的培养基中培养混合的乳杆菌种群而得到。在 GB 2 251 864 中，没有公开有关得自低温稳定的乳杆菌的乳酸的产量或光学纯度的任何内容。

DE 27 00 644（与 GB 1547063 相同）公开了在具有 4 和 4.7 之间 pH 的培养基中使用形成乳酸的、耐酸的粪链球菌（Streptococcus faecalis）或明串珠菌（Leuconostoc）进行的植物和/或动物原料发酵，以形成用于饲养场以及家畜和家禽的饲料。在特定 pH 下的乳酸的产量没有被公开。

所有这些基于乳杆菌的发酵来生产游离酸形式的乳酸的方法都有一个或多个缺点。基于其它更能耐酸的微生物发酵的可选方法也已被报道过。与乳杆菌相比，酵母－例如酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）－能够在低得多的 pH 下生长。已经通过将来自细菌（乳杆菌）或哺乳动物（牛）来源的乳酸或乳酸盐脱氢酶基因导入酿酒酵母的方法产生了重组酵母菌株。据报道，重组酵母菌株能够在等于或低于乳酸的 pK_a（大约 3.8）下生产乳酸或乳酸盐。然而，乙醇是这些重组酵母菌株生产的主要发酵产品。这既降低了乳酸或乳酸盐生产的效率也导致了另外的潜在问题，即分离和纯化游离乳酸的问题。通过一种小球状的真菌米根霉（*Rhizopus orgyzae*）生产乳酸也曾经被报道过。这种真菌发酵通常还产生甘油和/或乙醇作为主要副产物。在这种情况下，通过使用一个聚乙烯吡啶（"PVP"）柱将游离乳酸从发酵液中连续除去，游离乳酸的产量得到了优化。使用根霉/PVP 方法，在低的发酵 pH 下，还没有所产生的乳酸或乳酸盐浓度高于大约 25 g/L 的报道。

本发明涉及通过发酵生产乳酸或乳酸盐。它特别涉及使用耐酸的乳酸或乳酸盐生产微生物－例如耐酸的细菌－来生产具有高浓度游离乳酸的发酵液。高浓度游离乳酸的存在能够简化下游加工过程，需要该过程将乳酸或乳酸盐以游离酸的形式从发酵液中分离出来。

通常已经确定，使用使发酵液（或其它乳酸／乳酸盐混合物）处于大约 4.8 或更低（优选 4.5 或更低，最优选 4.3 或更低，通常 3.5 至 4.2）pH 的方法，就能开发一个总体上有效的方法，其中所产生的乳酸可用于聚合物生产，而且如果需要的话，回收的乳酸盐可以被循环回发酵系统作为一种缓冲剂，或被有差别地处理以控制 pH。

本文所提供的用于生产乳酸的方法包括，在使大部分的乳酸或乳酸盐产品处于游离酸形态的 pH 下、在营养培养基中培养耐酸的乳酸或乳酸盐生产微生物，例如耐酸的纯乳酸乳杆菌（homolactic lactobacillus）。在这里，当术语“耐酸的”被用于与细菌相联系时，其目的是指该细菌能够在足以使大部分乳酸或乳酸盐产品处于游离酸形态的 pH 下生产乳酸或乳酸盐。耐酸的细菌通常能够生产至少大约 25 g/L 的游离乳酸。在不高于大约 4.2 的“平均培养 pH”下，这种细菌一般还可以在营养培养基中生产至少大约 50 g/L 的乳酸或乳酸盐（即 50 g/L 的总乳酸）。

如果发酵没有进行到限制性乳酸或乳酸盐浓度被达到的程度，“平均培养 pH”的确定是基于在发酵过程中的十个（10）或更多个相等时间间隔处所测定的 pH 值的平均值。本发酵方法可以以一种连续的方式操作。在这种情况下，当一个初始的启动阶段结束后，通常能够达到稳态条件（在 pH、乳酸或乳酸盐浓度和营养物浓度方面）并保持下去。当发酵以这种方式进行时，平均培养 pH 就是初始启动阶段完成后发酵液的平均 pH，也就是说，在确定平均培养 pH 时忽略启动阶段的 pH。

如果发酵进行到 pH 和／或乳酸浓度抑制进一步乳酸或乳酸盐生产的程度，“平均培养 pH”的确定是基于在产生 90%的限制性乳酸或乳酸盐浓度所必需的时间段内的十个（10）或更多个相等时间间隔处所测定的 pH 值的平均值。此处所使用的“限制性乳酸或乳酸盐浓度”是在一套给定

的培养条件（营养培养基、温度、通气程度）下的乳酸或乳酸盐浓度，在该条件下，发酵所产生的 pH 和／或乳酸浓度抑制进一步的乳酸或乳酸盐发酵。此处所使用的术语“限制性培养 pH”是指在一套给定的培养条件下的发酵液的 pH，在该条件下，pH 和／或乳酸浓度抑制进一步的乳酸或乳酸盐发酵。在相同的条件下，当进一步培养的时间达到大约十二（12）小时后所产生的乳酸或乳酸盐量的增加不高于大约 3%时，就认为乳酸或乳酸盐生产已经被抑制。该定义假设在发酵液中仍有足够的用于乳酸或乳酸盐生产的营养物。

此处的术语“营养培养基”和“发酵液”可以互换使用。这些术语既可以指（i）初始提供给耐酸的细菌作为营养源的培养基，也可以指（ii）初始提供的营养物被部分或全部消耗并且细菌已经将包括乳酸或乳酸盐的发酵产物分泌到了这种培养基中后所产生的培养基。

在本发明的方法中，在培养耐酸细菌以生产乳酸或乳酸盐后，发酵液的 pH 通常不高于大约 4.2（“最终培养 pH”）。此处的“最终培养 pH”是指耐酸细菌的生长和／或乳酸或乳酸盐生产停止时发酵液的 pH。生长和／或乳酸或乳酸盐生产停止的原因，可以是反应温度的改变、发酵液中一种或多种必需营养物的耗尽、人为改变 pH、或使发酵液与细菌细胞分离。在通过向发酵液中添加足够的酸或碱来终止发酵以停止乳酸或乳酸盐生产的情况下，最终培养 pH 被定义为就在添加之前的营养培养基的 pH。另外，生长和／或乳酸或乳酸盐生产停止的原因可以是一种或多种发酵产物的积累和／或由于发酵产物的积累而导致的培养液 pH 的改变，也就是说，在给定的一套培养条件下发酵反应达到了一种自我限制的程度。如上所述，生产有机酸－例如乳酸－的细菌发酵受到终产物抑制是相当普遍的。

在本申请中使用的术语“乳酸或乳酸盐”是指 2-羟基丙酸的游离酸或盐形态（即“总乳酸”）。术语“乳酸”和“游离乳酸”可互换使用，在此处它们是指酸的形式，即 2-羟基丙酸。乳酸的盐形态在此处特指一种乳酸盐，例如乳酸的钠盐或乳酸钠。

本发明还提供耐酸的纯乳酸细菌（homolactic bacteria）。在至少

大约 40℃的培养温度下，耐酸的纯乳酸细菌通常能够生产至少大约 25 g/L 的游离乳酸。在高于大约 40℃的温度和不高于大约 4.2 的平均培养 pH 下，本耐酸细菌的另外一个实例能够生产至少大约 50 g/L 的乳酸或乳酸盐。通常，耐酸细菌对上述两种乳酸或乳酸盐生产力的量度标准都能满足。

图 1 是一个发酵流程的示意图，其中包括耦合的游离乳酸除去过程。

图 2 是一个曲线图，它显示从玉米浸渍液中分离出的一些乳酸或乳酸盐生产细菌菌株的核糖型模式。

图 3 是一个曲线图，它显示在含有 10 vol.%玉米浆、100 g/L 葡萄糖和 33.4 g/L 碳酸钙的营养培养基中，培养菌株＃41 时的葡萄糖、果糖和乳酸或乳酸盐的发酵侧形。

图 4 是一个曲线图，它显示在含有 90 g/L 葡萄糖、33.4 g/L 碳酸钙以及 12 vol.%玉米浆或 36 vol.% 稀浸渍液（light steep water）的营养培养基中，培养菌株＃41 时的乳酸或乳酸盐产量。

图 5 是一个曲线图，它显示在含有 90 g/L 葡萄糖、36.6 g/L 碳酸钙以及不同量的玉米浸渍液的营养培养基中，培养纯乳酸或乳酸盐菌株＃41 时的葡萄糖、果糖和乳酸或乳酸盐的发酵侧形。

图 6 是一个曲线图，它显示与 pH 相对应的未离解的乳酸（“游离乳酸”）的百分比。

通过细菌学系统产生具有大约 5.0 或更低、优选 4.8 或更低以及一般 3.5 至 4.5 的 pH 的乳酸溶液，会导致在乳酸或乳酸盐物质的生产中乳酸形态有更高的百分比。通过发酵过程产生具有乳酸形态－而不是乳酸盐－的相对大量的产品是有利的，因为它能够减少－或在一定程度上减少－对后续的酸化和／或“盐分裂”步骤的需求。也就是说，如果大量的物质以游离乳酸的形态产生，那么由乳酸或乳酸盐生产乳酸的处理步骤、费用以及与其相关的后续步骤都可以被减少或避免。即使进行一定程度的酸化，与高 pH 系统相比，此时酸的添加量将相当少。通常已经确定，使用使发酵液处于大约 4.8 或更低（优选 4.5 或更低，最优选 4.3

或更低，通常 3.5 至 4.2）pH 的方法，就能开发一种总体上有效的方法，在该方法中所产生的乳酸可用于聚合物生产，而且回收的乳酸盐可以被循环回发酵系统作为一种缓冲剂，或被有差别地处理以用于控制 pH。

通过在适当的营养培养基中培养耐酸的纯乳酸细菌，本方法能够有效地生产乳酸或乳酸盐，尤其是有效地生产高浓度的游离乳酸。耐酸的纯乳酸细菌可以从来自商用玉米研磨设备的玉米浸渍液中分离。尽管这种类型的不同细菌可以生产外消旋乳酸或乳酸盐，或者主要是 D-或 L-异构体形式的乳酸或乳酸盐，本方法优选使用主要生产 L-或 D-乳酸或乳酸盐的纯乳酸细菌，最优选使用生产光学纯形式的 L-乳酸或乳酸盐的纯乳酸细菌。

本方法能够有效地生产高浓度的游离酸形态的乳酸的一种旋光异构体。该有效性可以以各种方式表达。发酵液中的游离乳酸浓度可作为本方法的总体生产能力的一个量度。本方法通常产生一种溶液，其中含有至少大约 25 g/L、优选至少大约 30 g/L、更优选至少大约 40 g/L 的游离乳酸。最优选地，本方法生产具有上述浓度的游离 L-乳酸或游离 D-乳酸。所生产的乳酸盐（以及游离乳酸）的光学纯度优选为至少大约 50%，更优选为至少大约 80%，最优选所生产的乳酸或乳酸盐的旋光异构体基本上处于纯态。

如上所述，通过本方法所生产的乳酸或乳酸盐通常主要处于 L-乳酸或乳酸盐的形态。例如，本方法的一个实施方案包括在营养培养基中培养一种耐酸的纯乳酸细菌以生产乳酸或乳酸盐，该乳酸或乳酸盐中含有至少大约 75 wt.%的 L-乳酸或乳酸盐（即具有至少大约 50%光学纯度的 L-乳酸或乳酸盐）。优选地，本方法所生产的乳酸或乳酸盐的光学纯度至少为大约 80%，更优选为至少大约 90%（例如，含有至少大约 95 wt.%的 L-乳酸或乳酸盐）。最优选地，本方法生产基本上处于光学纯态（即所生产的乳酸或乳酸盐含有 99 wt.%或更高的单一旋光异构体）的 L-或 D-乳酸或乳酸盐。

如果发酵液的 pH 值在 3.0 和 4.5 之间，将有相当大量的乳酸以未解离的状态存在（参见图 6）。实际上，在 pH 3.0 下，游离乳酸（未解离的）

与乳酸根离子的摩尔比在25℃下是大约7.0；而且，在pH大约为4.5时，该比值在25℃下是大约0.23。存在于溶液中的游离乳酸的总量是溶液pH和混合物中乳酸或乳酸盐总体浓度二者的函数。因此，详细说明某一给定溶液－例如发酵液－的这两个参数将有效地确定游离乳酸的浓度。本方法能够在较低的pH下生产一种溶液，其中含有至少大约50 g/L、优选至少大约80 g/L、更优选至少大约100 g/L的乳酸或乳酸盐。溶液的pH越低，以游离酸形态存在的乳酸或乳酸盐的百分比就越高。例如，在培养基的pH等于乳酸的pK_a（大约3.8）时，50%的乳酸或乳酸盐以游离酸的形态存在。在pH 4.2下，大约31%的乳酸或乳酸盐是游离酸，而在pH4.0和3.9下，分别有大约41%和47%的乳酸或乳酸盐以游离酸形态存在。在更高的pH下，游离乳酸的比率更低，pH 4.5时是18%，pH 5.0时是6.6%。

在培养步骤中，发酵液的pH可以用许多不同的方式表达，例如用平均培养pH或最终培养pH表达。本发酵方法通常能够在不高于大约4.3、优选不高于大约4.2、以及更优选不高于大约4.0的平均培养pH下生产高浓度的乳酸或乳酸盐。另外，在培养过程中，发酵液的pH可以以最终培养pH的方式表达。本方法通常能够在不高于大约4.2、优选不高于大约4.0、以及更优选不高于大约3.9的最终培养pH下生产高浓度的乳酸或乳酸盐。在不高于大约4.0的平均培养pH和/或不高于大约3.9的最终培养pH下，本发酵方法的特别有效的实施方案能够生产至少大约80 g/L的乳酸或乳酸盐。

本发酵方法可以以一种连续的方式操作，在这种方式中，随着发酵的进行，发酵液的一部分被移走。该操作可以连续地或以定期的间隔进行。通常将充足的营养培养基加入反应器中以维持恒定的液体体积。在这种发酵条件下，当初始的启动阶段结束后，通常能够达到稳态条件（在pH、乳酸或乳酸盐浓度和营养物浓度方面）并保持下去。当发酵以这种方式进行时，发酵液的平均培养pH（初始阶段的pH被忽略）和最终培养pH基本相同。在这种情况下，发酵通常在不高于大约4.2、优选不高于大约4.0、以及更优选不高于大约3.9的pH下进行。

尽管本培养方法可以在较低的温度、例如大约 30℃至大约 38℃下进行，通常还是在适当的营养培养基中在至少大约 43℃、更优选大约 45℃至大约 52℃的温度下培养耐酸的纯乳酸细菌。最优选地，发酵在大约 47℃至大约 50℃下进行。发酵在这些温度下操作有许多优点。在该温度范围内，由其它竞争性微生物的生长而导致的复杂化的可能性被减少。另外，在更高的温度下，反应通常以更快的速率进行，从而能够有效地利用处理设备。如果发酵在过高的温度下进行，通常在大约 54℃或更高，纯乳酸细菌的生长和/或乳酸或乳酸盐生产就可以忽略不计。然而，使用标准的选择技术来鉴别突变的纯乳酸细菌菌株是可能的，这些菌株能够在 55℃和更高的温度下生长和生产乳酸或乳酸盐。

此处所描述的“营养培养基”是指一种水基的组合物，其中包括本发明的细菌生长所必需的矿物质和它们的盐。营养培养基通常含有有效量的碳源、氮源、磷酸盐源、硫酸盐源、钙和微量元素。术语“微量元素”是指以痕量浓度－例如百分之 1 的微小部分（1000 ppm 或更少）－存在的生长所必需的元素。

本发明的细菌通常能够利用许多碳和能量源用于生长和／或乳酸或乳酸盐生产，例如葡萄糖、果糖、半乳糖、蜜二糖、蔗糖、棉子糖、和／或水苏糖。一些细菌能够使用全部或大部分的上述糖作为碳和能量源，而其它菌株则更为苛求并且只能在上述一种或两种糖中生长。在其它情况下，淀粉（例如玉米淀粉）或其水解产物可被用作主要的碳水化合物来源。

此处所使用的“玉米浸渍液”是指获自玉米浸渍罐的液体，或获自具有基本相同营养谱的由其衍生的其它溶液。例如，玉米浆（有时也被称作“浓浸渍液”）是通过除去水和其它可挥发组分得到的玉米浸渍液的浓缩形式，通常在真空下进行。玉米浆通常具有大约 35 wt.%至大约 50 wt.%的干固体含量。在本发明实施例中所描述的实验中所使用的玉米浆具有 36 wt.%的干固体含量，在此处被称为“CSL”。 在进行浓缩以生产玉米浆之前，直接从玉米浸渍罐和／或与其相连的管道得到的玉米浸渍液通常的干固体含量范围为大约 10 wt.%至大约 15 wt.%，此处被称作“稀浸渍液”

("LSW")。稀浸渍液通常含有不高于大约 500 ppm 的 SO_2 含量。在本方法中使用的用于补充营养培养基的浸渍液优选具有不高于大约 300 ppm、更优选不高于大约 200 ppm 的 SO_2 含量。在本发明实施例所描述的实验中所使用的稀浸渍液具有 12 wt.%的干固体含量。

当从玉米浸渍液中分离的一种或多种纯乳酸菌株将用于生产乳酸或乳酸盐时，营养培养基通常含有与至少大约 15 g/L 浸渍液干固体相当的玉米浸渍液。优选地，营养培养基包含与至少大约 25 g/L 浸渍液干固体、更优选至少大约 30 g/L 浸渍液干固体相当的玉米浸渍液。

用于本发酵方法的适当营养培养基的一个实例是 MRS 培养基（例如可从 Becton Dickinson & Co.购得的 MRS 培养基）或同类的培养基。MRS 培养基一般补充有玉米浸渍液以提供氮源和一般的营养源，还补充有附加的碳水化合物（例如葡萄糖或果糖）作为碳和能量源。适于本方法使用的典型的培养基还包括镁盐、锰盐、磷酸盐、钾盐和／或柠檬酸盐。但是，向培养基中加入确定量的上述盐类可能是没有必要的。通常，营养培养基还包括一种非离子表面活性剂，例如脱水山梨糖醇的聚氧乙烯衍生物的脂肪酸单酯（例如吐温 80（Tween^R 80）是聚氧乙烯（20）山梨糖醇酐单油酸酯）.

培养基的制备可以使用单独的盐作为各种无机组分中的每一种的来源。另外，用于制备营养培养基的一种单一的盐可以充当多于一种组分的的来源。例如，加入的磷酸氢钾（K_2HPO_4）既可以作为钾阳离子的来源也可以作为磷酸根阴离子的来源。可以认识到，在制备营养培养基的过程中，各种组分被溶解在水中之后，所存在的各种溶解的盐之间的阳离子和阴离子将发生交换。例如，如果在制备培养基的过程中硫酸镁和柠檬酸铵被加入到水中，所得到的溶液除包含硫酸镁和柠檬酸铵外，还将包含一些硫酸铵和柠檬酸镁。一种特别适于本发酵方法使用的营养培养基类型含有补充有葡萄糖和／或果糖作为附加碳和能量源的玉米浸渍液。

用于本发明的适当的培养基的一个实例包括:

与大约 30 至大约 45 g/L 浸渍液干固体相当的玉米浸渍液;

大约 80 至大约 120 g/L 的葡萄糖、果糖或它们的混合物;

大约 0 至大约 10 g/L 的酵母膏;

大约 0 至大约 1 g/L 的诸如吐温 80 的非离子表面活性剂;

大约 0 至大约 2 g/L 的磷酸氢钾（K_2HPO_4）;

大约 0 至大约 0.2 g/L 的硫酸镁（$MgSO_4$）;

大约 0 至大约 0.05 g/L 的硫酸锰（$MnSO_4$）;

大约 0 至大约 2 g/L 的柠檬酸铵; 以及

可选地，大约 10 至大约 50 g/L 的碳酸钙（$CaCO_3$）。

由于上面所讨论的原因，这些量是指用于形成培养基所加入的各种物质的量，而不是指这些物质在营养培养基中的真实浓度。在配制这种营养培养基的过程中，除了非离子表面活性剂和碳酸钙外，所有成分通常都被溶于适量的水中并在高压蒸汽灭菌器中灭菌。非离子表面活性剂通常被加入到经高压蒸汽灭菌、仍具有接近大约 100℃温度的培养基中。在碳酸钙被随后加入之前，通常使所得到的溶液冷却至大约 60℃或更低。

已经发现，用于本方法的适当的营养培养基优选含有至少大约 50 g/L 的碳水化合物。更优选地，营养培养基含有至少大约 70 g/L、以及最优选至少大约 90 g/L 的碳水化合物。碳水化合物通常由葡萄糖、果糖、半乳糖、蜜二糖、蔗糖、棉子糖、水苏糖或它们的混合物组成。葡萄糖、果糖和蔗糖特别适用于在营养培养基中作为碳和能量的来源。在培养基中加入超过大约 150 g/L 的碳水化合物通常是无益的。

已经发现，培养基中含有一种碱可能是有益的，例如碳酸钙（$CaCO_3$）、氢氧化钠（NaOH）、氢氧化铵（NH_4OH）和/或碳酸氢钠（$NaHCO_3$）。通常至少大约 30 g/L 的碳酸钙（或等当量的其它碱）被加入到营养培养基中。在本方法的一些实施方案中，例如，生产高浓度乳酸或乳酸盐的实施方案中，在营养培养基中含有至多大约 40 g/L 的碳酸钙将是优选的。由于碳酸钙盐溶解度的限制以及保持较低发酵液 pH 的期望，尽管可以使用更高浓度的碱，但在培养基中加入超过大约 100 g/L 的碳酸钙通常是无益的。特别经常地，所存在的碳酸钙在开始时不会完全溶解在营养培养基中。随着发酵的进行，一些碳酸钙会与正在形成的乳酸反应以生成乳酸

钙。当这种情况发生时，未溶解的碳酸钙的另外部分就会被溶入溶液中。总体的效果是中和一部分正在形成的乳酸并防止发酵液的 pH 降至所希望的水平之下（例如，低于大约 3.8-3.9）。

为达到上述效果，并不一定要加入诸如碳酸钙的碱。可以加入含有一种乳酸盐（例如乳酸钙、乳酸钠或乳酸铵）的溶液以帮助缓冲发酵液的 pH。这种情况可能发生的方法的一个实例包括，将发酵液的一部分与正在培养的细菌分离以及将该部分的一些或全部乳酸除去后再将该部分循环回发酵过程中。另外，乳酸钙可以被从发酵液中分离（例如以固体形态）并与加入到发酵过程中的营养培养基相混合。通常，加入乳酸盐作为缓冲盐是有益的，因为它使加入到发酵液中的中和碱的量减到最少，因而使转化成盐形态的乳酸或乳酸盐产品的量减到最少。

含有至少大约 70 g/L 葡萄糖和／或果糖以及至少大约 20 g/L 碳酸钙的营养培养基特别适于在本方法中使用。根据本方法中所使用的细菌菌株，在该营养培养基中加入玉米浸渍液（例如以与至少大约 25 g/L 玉米浸渍液干固体相当的量）也可以是优选的。特别有益的是，加入的玉米浸渍液中只含有与通过发酵过程所产生的乳酸或乳酸盐的手性形式相同的乳酸或乳酸盐。

通常选择纯乳酸细菌的菌株和发酵条件，以使游离乳酸以至少大约 0.5 g/L/hr、优选至少大约 1.0 g/L/hr、更优选至少大约 2.0 g/L/hr、以及最优选至少大约 4.0 g/L/hr 的总速率生产。此处所使用的乳酸盐或游离乳酸（或者乳酸或乳酸盐）的总生产速率的计算是用所生产的游离乳酸（乳酸或乳酸盐）的总量除以培养时间。对于产生限制性乳酸或乳酸盐浓度的发酵而言，游离乳酸（乳酸或乳酸盐）的总生产速率的计算以产生 90%的限制性游离乳酸（乳酸或乳酸盐）浓度所需要的时间为分母。

本方法的生产能力还可以用乳酸或乳酸盐的总生产速率来表示。本发酵方法通常在以至少大约 1.0 g/L/hr、优选至少大约 2.0 g/L/hr、以及更优选至少大约 3.0 g/L/hr 的总速率生产乳酸或乳酸盐的条件下进行。如上所述，优选在上述速率下，在处于不高于大约 4.1、更优选不高于大约 4.0 的平衡培养 pH 下的发酵液中生产乳酸或乳酸盐。

用于本发酵方法的纯乳酸细菌的适当实例可以容易地从诸如来自商用玉米研磨设备的玉米浸渍液的样品中分离出来。另外，从不同来源分离出的某些其它纯乳酸细菌也可能具有所需的能力，该能力使高浓度游离乳酸的有效低 pH 生产成为可能。

由于在玉米浸渍液中发现的纯乳酸细菌通常需要含有用于生长的玉米浸渍液的营养培养基，所以在用于鉴别和分离这种细菌的方法中，初始步骤通常包括将样品涂布在含有浸渍液的培养基例如 10 vol.%的 CSL-MRS 琼脂上，然后在大约 45-50℃下对接种的培养基进行厌氧培养。通过将细菌分离物转入只在较低的相中含有浸渍液的双相培养基中，由于杂乳酸的生产，细菌分离物可以被容易地探测到。然后监测正在生长的菌株在双相试管底部气体的产生。所分离的菌株可以方便地在低温下（例如 4℃或更低）贮藏或保存在浸渍液／蕃茄汁／MRS 琼脂生长培养基中作为实验储备物（bench stock）。当需要时，以这种方式从玉米浸渍液中分离的一种或多种耐酸菌株可以在乳酸发酵中作为接种物。

使用这类方法，从美国的五种不同的玉米研磨设备以及位于土耳其、英格兰和荷兰的三种玉米研磨设备中得到的浸渍液样品被用于检测乳酸或乳酸盐生产微生物。所分离的微生物在开始时被检定为杂乳酸（即除乳酸或乳酸盐外还能生产其它的发酵产物）或纯乳酸生产者。对其中的纯乳酸菌株的进一步检定，特别是根据总体的乳酸或乳酸盐产量、所生产的乳酸或乳酸盐的旋光性、以及－在很多情况下－在发酵培养基中没有加入碱（$CaCO_3$）时的最终发酵 pH。总共分离了 155 种细菌菌株。在所检定的 109 种菌株中，98 种菌株（90%）生产乳酸或乳酸盐作为唯一的发酵产物（“纯乳酸”菌株）。此处所使用的术语“纯乳酸”是指一种基本上只产生乳酸作为发酵产物的细菌菌株。剩余的 11 种菌株（11%）除乳酸或乳酸盐外还产生其它发酵产物（“杂乳酸”菌株）。在 98 种纯乳酸菌株中，22 种是 L-乳酸或乳酸盐生产者，18 种是 D-乳酸或乳酸盐生产者，58 种生产外消旋乳酸或乳酸盐。

本纯乳酸细菌通常能够生产至少大约 25 g/L 的游离乳酸。更优选地，该细菌是能够生产至少大约 30 g/L 的游离 L-乳酸的纯乳酸细菌。在本发

明的另一个实施方案中，纯乳酸细菌在不高于大约 4.3 的平均培养 pH 下能够产生一种溶液，该溶液含有至少大约 40 g/L、优选至少大约 75 g/L、以及优选至少大约 90 g/L 的乳酸或乳酸盐。如同其它部分所讨论的，本纯乳酸细菌特别有效的菌株能够在不高于大约 4.0 的平均培养 pH 和／或不高于大约 3.9 的最终培养 pH 下以上述水平生产 L-乳酸或乳酸盐（或 D-乳酸或乳酸盐）。

本耐酸纯乳酸细菌通常能够在大约 35℃至大约 53℃之间的温度下生长和产生乳酸。尽管已经显示纯乳酸细菌能够在等于或接近室温的温度下生长，但是生长的最佳温度范围通常从大约 43℃到大约 52℃，优选为大约 47℃到大约 50℃。当温度高于大约 53℃或低于大约 30℃时，通常发生的情况是细菌所生产的乳酸或乳酸盐可以忽略不计。发酵过程优选在大约 47℃至大约 52℃下进行，原因是酵母和杂乳酸乳杆菌较不耐热，而且通常在这种温度下即使生长，也不能良好地生长。这样，除了促进乳酸或乳酸盐生产外，耐酸纯乳酸细菌在高温下的发酵能够减小出现问题的可能性，所述问题与其它生物的污染有关。

本纯乳酸细菌通常能够在至少大约 3.7 至大约 6.5 的 pH 范围内、以及优选在从大约 3.8 至大约 5.0 的 pH 范围内生长和产生乳酸或乳酸盐。尽管该细菌可以在接近中性（例如 6.0-6.5）的 pH 下生产乳酸或乳酸盐，但是应用于本方法的细菌优选能够在一定的 pH 下生产高浓度的乳酸或乳酸盐，在该 pH 下大部分的乳酸或乳酸盐以其游离酸的形态存在。优选的耐酸纯乳酸细菌种类能够在 4.2 或更低的 pH 下有效地生产乳酸或乳酸盐（例如，至少约 50g/L）。

在本发明中可以使用各种反应器形式，包括填充床反应器、连续搅拌釜式反应器、旋转式生物接触反应器、顺序间歇式反应器以及流化床反应器。整个反应可以在一个单独的反应器中进行，该反应器具有适当方式来控制发酵液的温度，或者可选地，发酵可以在第一个容器中进行，发酵液可以通过经过一个热交换器－例如板式换热器－保持在所需的温度并循环回发酵反应中。后一种设备能够使反应混合物更快速地冷却，而且在一些情况下，在使发酵液通过一个膜分离组件以除去发酵液的一

部分的同时，该设备也能运行（例如，热交换器和膜组件被串联时）。

一种通常使用的形式包括膜循环生物反应器。该类型的反应器通常包括两个组件，即一个发酵容器 10 和一个膜组件 15（参见图 1）。这两个组件可以用一根管相连，或者分别是一个单独设备的一部分。

在本发明的一个实施方案中，可以在发酵容器中的第一部分营养培养基中培养耐酸的纯乳酸细菌，以产生含有至少大约 25 g/L 游离 L-乳酸的第一种产物溶液。可以将所得到的发酵液分离以提供第一部分，该部分含有游离乳酸并基本上不含有细菌细胞。这可以通过用泵使发酵液的一部分通过一个细胞分离器（例如中空纤维细胞分离器）来完成。含有细胞的部分通常被循环回发酵容器中（例如参见图 1），而含有乳酸的部分被分离出来以进一步处理。通常加入附加的营养培养基以使发酵容器中的液体体积保持在一个恒定水平。当发酵以上述方式进行时，在初始的启动阶段结束后，通常能够达到稳态条件（在 pH、乳酸或乳酸盐浓度和营养物浓度方面）并保持下去。当在这种模式下运行时，本发酵过程通常在这样的条件下操作，即发酵液的 pH 被保持在大约 4.2 或更低，优选在大约 3.7 至 4.0 的范围之间。

被分离出来的含有乳酸的部分可以用许多已知的方法处理，以将游离酸从溶液的其它组分中分离出来。例如，可以使用一种含有叔胺的萃取剂把乳酸从溶液中萃取出来。适当萃取剂的一个实例是溶在辛醇中的 Alamine 336 的溶液。其它可以用于分离乳酸的方法包括使溶液与一种固体吸附剂－例如一种离子交换树脂（例如一个聚乙烯吡啶柱）－相接触，蒸馏出含乳酸的部分，或通过膜分离除去乳酸。上述任何类型的分离方法都可以被用于处理含有乳酸的部分以产生一种乳酸贫化的部分和一种乳酸分离部分。乳酸贫化部分可以含有一些乳酸盐形态的乳酸，例如乳酸钙。可以使用许多已知方法中的任何方法来进一步处理乳酸或乳酸盐分离部分，以产生游离乳酸的更为纯净的形态。

还可以处理含有乳酸的部分以分离出固体或液体形态的乳酸盐（例如乳酸钙），剩下富含游离乳酸的溶液。可以使用适当的技术来分离乳酸盐，例如萃取、结晶、膜分离以及在固体材料（例如阴离子交换树脂）

上的吸附。可以使乳酸盐返回发酵容器中，在其中它可以用来缓冲溶液的 pH 并防止发酵液的 pH 降至所希望的水平之下。例如，通过使作为缓冲剂的足够量的乳酸钙循环，发酵液的 pH 可以被保持为接近于乳酸的 pK_a 的值。根据理论，在 3.85 的 pH 下，乳酸盐可以缓冲等当量的新的乳酸产生。在 pH 4.0 下，每一当量的乳酸盐将缓冲 0.7 当量的新的乳酸产生。

能够使用多种方法来处理涉及产生大量乳酸的乳酸盐／乳酸溶液；例如，在 pH 不高于大约 4.8（优选不高于大约 4.2 或 4.3）、来自发酵液的溶液中；以及，使用伴随的乳酸盐（通常为乳酸钙、乳酸钾、乳酸钠和／或乳酸铵）分离（和循环，如果需要的话）过程。举例来说，这些方法被描述于以 John N. Starr、Aharon M. Eyal、Riki Canari、Betty Hazan 以及 Rod Fisher 为发明人、被共同转让（给明尼苏达州，Minnetonka 的 Cargill 有限责任公司）、共同申请的美国专利申请中，其题目为乳酸处理；方法；设备；以及产品（以后被称作 Starr 等人的申请）。Starr 等人的申请的提出日期与本申请相同（1997 年 10 月 14 日）。有利的整体处理方法将部分取决于对于各种方法的选择，其中的一种方法在大规模实施时最有利于一种整体上合算的和有效的处理方案的进行。

在整体方法的选择中，该原则涉及系统的设计，以达到两个目标：

1. 乳酸产品的分离，以进行后续的加工，例如生产聚合物；以及

2. 乳酸盐的分离，优选以所希望的形态，以使其循环回发酵液。

三种通常的方法涉及：

1. 从溶液中分离出乳酸，留下乳酸盐；如果需要的话，将分离后含有乳酸盐的剩余溶液加入发酵罐中；

2. 将乳酸盐从溶液中分离出来；如果需要的话，将乳酸盐加入发酵罐中；以及在乳酸盐分离后，从剩余溶液中后续分离乳酸产品；以及，

3. 同时将乳酸分离进一股物流、乳酸盐分离进另一股物流，剩下剩余的混合物。

Starr 等人所描述的用以实现上述一个或两个目标的技术可以在各种乳酸或乳酸盐物质的溶液（即乳酸和溶解的乳酸盐的溶液）中实施。这

些溶液可以包括发酵液或被从发酵罐中除去并以某种方式改变－例如通过过滤或 pH 调节－的发酵液。实际上，该技术也能够被用于以其它方式生产的溶液。

然而，该技术以及其中的建议是特别开发的，其重点在于发酵液溶液－特别是比较酸性的溶液－的有效处理，其中不再需要通过加酸来调节 pH，优选地此过程没有发生。上述技术可以被应用的典型组合物，在 pH 方面，将至少为 0.86 并低于 6.0。也就是说，可以实施本技术的典型组合物将具有在上述范围内的 pH。对于这种组合物，游离乳酸与解离的酸或溶解的乳酸盐在 25℃下的摩尔比在大约 1,000:1 至 0.007:1 的范围内。更优选的处理方法将涉及具有大约 1.98-5.00 的 pH 的溶液（HLA: LA 的比值在大约 75:1 至 0.070:1 的范围内）；而且，最优选的处理方法将涉及具有大约 3.0-4.5 范围内的 pH 的溶液（HLA:LA 的比值在大约 7.0:1 至 0.23:1 的范围内）。

如上所示，通过本发酵方法很容易得到上述在最优选的 pH 范围内的溶液，其中含有高浓度的乳酸或乳酸盐物质。另外，可以使用其它的发酵液，例如通过加酸进行 pH 调节，通常调节到所给定的最优选的 pH 范围内。

此处有时将涉及“优先分离”：从含有乳酸和乳酸盐的组合物中分离出乳酸；或者，从含有乳酸和乳酸盐的组合物中分离出乳酸盐。在本文的上下文中，术语“优先分离”或其变体的意思是指分离技术，与另一组分相比，该技术优先地除去两种组分中的一种（乳酸或乳酸盐）。在根据本发明的典型的优选处理方法中，乳酸和乳酸盐的混合物被分成两股“产品流”。在一股产品流中（即富含游离乳酸的物流），所得到的优选的游离乳酸与乳酸盐的摩尔比为至少 2/1，优选至少 3/1。利用此处所描述的某些技术，至少 5/1 的比率以及实际上 10/1 或更高的比率是很容易得到的。

另一股产品流是富含乳酸盐的物流。在该物流中，优选的游离乳酸与乳酸盐的摩尔比不高于 0.5。利用此处所描述的典型的优选处理方法，不高于 0.3、优选不高于 0.2 以及最优选不高于 0.1 或更低的比率是很容

易得到的。

在上两段所示的上下文中，所使用的术语“物流”的意思是指一种分离的相或产品部分，其中并不考虑该相或产品部分是溶液、固体或物质的混合物。因此，“富含乳酸的物流”仅指与处理的初始混合物相比，富含乳酸（与乳酸盐相对）的一相或混合物；“富含乳酸盐的物流”是与处理的初始混合物相比，富含乳酸盐（与乳酸相对）的物流。

当富含游离乳酸的产品物流是通过将游离乳酸从混合物中－例如从一种发酵液中－分离出来而得到时，在游离乳酸方面，游离乳酸被除去后的剩余的含水混合物有时将被称作“贫化的”。相似地，当富含乳酸盐的物流是通过将乳酸盐从含有游离乳酸和乳酸盐的混合物中分离出来而得到时，在乳酸盐方面，剩余的混合物有时将被称作“贫化的”。

优选地，当所处理的溶液是发酵液时，就提供或形成富含乳酸盐的产品物流，这样来自发酵罐的杂质与乳酸盐的重量比就比发酵液中的该比值低，优选至少低 5 倍。如同通过使用各种纯化技术－例如回洗或再结晶－一样，通过此处所描述的技术可以对上述情况进行控制，其中涉及对为乳酸盐的分离而选择的特别方法的控制。

为了方便地循环回发酵系统，乳酸或乳酸盐产品物流最终被优选地分离成一种含水溶液或水相与固体相的混合物，目的是保持水的平衡。如果为了促进水的平衡而使用了对含水溶液的浓缩，优选使用相对低成本的浓缩技术，例如反渗透和蒸汽再压缩。

通过下述实施例将对本发明进行进一步描述。这些实施例显示了本发明的范围，但并不限于此。在本发明构思内的变化将是显而易见的。

实施例 1－标准发酵条件

除非另外指出，描述于下述实施例中的发酵反应使用各种生长培养基、根据下述标准规程进行。

将在 40%蕃茄汁／40% LSW-MRS 琼脂下相／MRS 上相双相（TJ-SW-MRS 双相）中的细胞（250 ul）从特定菌株的实验储备物转入新鲜的 TJ-SW-MRS 双相培养基中，并在 47℃下静态条件下培养 18－24 小时。

MRS 培养基 （pH=6.2）

10 g/L	胰消化的明胶
8 g/L	牛肉膏
4 g/L	酵母膏
20 g/L	葡萄糖
2 g/L	K_2HPO_4
1 g/L	吐温 80
5 g/L	醋酸钠
5 g/L	柠檬酸铵
0.2 g/L	$MgSO_4$
0.05 g/L	$MnSO_4$

新鲜 TJ-SW-MRS 双相培养基中的 1.0 ml 等份的培养液被用于接种处于一个密封的血清瓶中、补充有 10% CSL、葡萄糖（总浓度 60 g/L）和碳酸钙（20 g/L）的 80 ml 培养基 B，并在 47℃下、在一个环境摇动器中摇动培养 18 小时。

培养基 B（pH=4.7）

8-12 vol.%	玉米浆
5 g/L	酵母膏
50-100 g/L	葡萄糖
2 g/L	K_2HPO_4
1 g/L	吐温 80
2 g/L	柠檬酸铵
0.2 g/L	$MgSO_4$
0.05 g/L	$MnSO_4$
20-40 g/L	$CaCO_3$

将培养时间为 18 个小时的培养基以 10%（v/v）的量接种入装有培养基 B 的发酵罐中，培养基 B 具有所需浓度的葡萄糖和碳酸钙（例如 90 g/L 的葡萄糖和 33.4 g/L 的碳酸钙）。发酵在 47-49℃、搅拌转速 150 rpm 以及发酵罐的 70-80%被充满的条件下操作。在这种液体容积水平下操作保证了培养基不会变得高度好氧。

实施例 2－不经 pH 控制的纯乳酸菌株分离

纯乳酸细菌菌株是从八个不同的工业玉米研磨设备得到的玉米浸渍液样品中分离的。这些设备位于内布拉斯加州的 Blair；爱荷华州的 Edyville；爱荷华州的 Cedar Rapids；俄亥俄州的 Dayton；田纳西州的 Memphis；土耳其的 Istanbul；英格兰的 Tillbury；以及荷兰的 Bergen Op Zoon。

通过获得来自商用玉米研磨设备的浸渍液样品，对菌株进行了分离。这些样品被涂布在 10%的 CSL－MRS 琼脂平板上（pH 5.0）并在 47℃下厌氧培养。为了分离，将菌落在 10%的 CSL－MRS 琼脂平板上再划线。为了保存，将分离物随后转入一种 40% LSW-40%蕃茄汁-MRS 下相／MRS 上相的双相培养基（pH6.0）中。通过杂乳酸的生产对所分离的菌株进行筛选，方法是监控试管底部气体（CO_2）的产生。随后在补充有 10 vol.%CSL 和 30 g/L 葡萄糖的 MRS 培养基中，通过乳酸或乳酸盐产量和所产生乳酸或乳酸盐的光学纯度对纯乳酸分离物进行筛选。结果示如下面的表 1 中。

所分离的细菌菌株被检定为不是纯乳酸或乳酸盐生产者（“纯乳酸或乳酸盐的”）就是杂乳酸或乳酸盐生产者（“杂乳酸的”）。基于在补充有 10 vol.%玉米浆（“CSL”）的 MRS 培养基中的发酵，所分离的纯乳酸细菌菌株是以总体乳酸或乳酸盐产量、最终发酵 pH 以及所产生的 L-乳酸或乳酸盐的百分数来检定的（参见下面的表 1）。由于所加入的玉米浆（“CSL”）中大约 50%的乳酸或乳酸盐通常是 D－乳酸或乳酸盐，生产至少大约 70% L-乳酸或乳酸盐的菌株就被认为是 L-乳酸或乳酸盐生产菌株。上述假设通过随后的实验得到了确认，在该实验中，存在于营养培养基中、来自于浸渍液的产品中的 D-乳酸或乳酸盐杂质水平是较低的（例如，较高

的乳酸或乳酸盐生产水平，或使用的玉米浸渍液具有高于 80％的 L-乳酸或乳酸盐（作为全部乳酸或乳酸盐的一部分））。

发酵在 48℃下、在实施例 1 中所描述的标准条件下进行。结果示于下面的表 1 中。

实施例 3－使用加入的碱来分离耐酸的纯乳酸菌株

一组附加的纯乳酸菌株被从玉米浸渍液样品中分离出来，这些样品来自 Edyville（爱荷华州）、Cedar Rapids（爱荷华州）以及 Blair（内布拉斯加州）的玉米研磨设备。采用的分离程序与实施例 2 中所述的相同。根据在补充有 10 vol.% CSL、90 g/L 葡萄糖和 33 g/L $CaCO_3$ 的培养基 B 中进行的发酵，对所分离的纯乳酸菌株进行检定。测定了该组菌株的整体乳酸或乳酸盐产量和／或所产生的 L-乳酸或乳酸盐的百分数。结果示于下面的表 2 中。

表 2

分离的纯乳酸菌株

菌株号	g/L 乳酸或乳酸盐	% L-乳酸或乳酸盐
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

实施例 4 - 所加入的碱对乳酸或乳酸盐生产的影响

对被确认为 L-乳酸或乳酸盐生产者的描述于实施例 2 中的许多菌株进行筛选，以考察加入的碱（$CaCO_3$）对乳酸或乳酸盐生产的影响。发酵在 48℃下、在补充有 10 % CSL 和 30 g/L 葡萄糖的 MRS 培养基中进行。在所加入的碱存在时所作的测定使用了补充有 10 % CSL、30 g/L 葡萄糖和 20 g/L $CaCO_3$ 的 MRS 培养基。

表 3

$CaCO_3$ 对乳酸或乳酸盐生产的影响

菌株#	乳酸或乳酸盐生产（g/L）	
	无碱	20 g/L 碳酸钙
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

实施例 5 - L-乳酸或乳酸盐生产

对描述于实施例 2 中的许多菌株的 L-乳酸或乳酸盐生产水平进行了检定。发酵在 48℃下、在补充有 10% CSL、30 g/L 葡萄糖和 20 g/L $CaCO_3$ 的 MRS 培养基中进行。

表 4

L-乳酸或乳酸盐生产

菌株#	% L-乳酸或乳酸盐	产生的乳酸或乳酸盐（g/L）
10	87%	39.12
14	79%	21.11
21	85%	38.56
23	85%	35.69
24	84%	31.78
41	86%	38.10
42	83%	30.62
43	80%	25.17
44	84%	31.75
46	86%	36.12

实施例 6－用 ATCC 保藏的乳杆菌属（Lactobacillus）菌株生产乳酸或乳酸盐

考察了许多已知乳杆菌属菌株的乳酸或乳酸盐生产能力，这些菌株是从玉米浸渍液之外的其它来源中分离出来的。从美国组织培养物保藏中心（American Tissue Culture Collection）（马里兰州的 Rockville）得到十一种不同菌株的样品，并基于在 37℃下、在补充有 75 g/L 葡萄糖和 30 g/L 碳酸钙的 MRS 培养基中的发酵，根据总乳酸产量和最终培养 pH 对菌株进行筛选。结果示于下面的表 5 中。所有菌株的生长在 47℃下都很差，并且被营养培养基中所存在的玉米浸渍液所抑制。尽管 ATCC 保藏菌株的营养要求与分离自玉米浸渍液的菌株不同，几个 ATCC 保藏的菌株似乎能够生产较高浓度的游离乳酸。特别是瑞士乳杆菌（*Lactobacillus helviticus*）（ATCC# 15009；在 4.03 的最终培养 pH 下生产 66 g/L 的乳酸或乳酸盐）、类干酪乳杆菌坚韧亚种（*Lactobacillus paracasei*

tolerans)(ATCC#25599, 在4.04的最终培养pH下生产66 g/L的乳酸或乳酸盐)以及唾液乳杆菌唾液亚种(*Lactobacillus salivarius salivarius*)(ATCC#11741; 在4.12的最终培养pH下生产64 g/L的乳酸或乳酸盐)似乎能够作为高产量游离乳酸的潜在生产者。测定了许多菌株所生产的乳酸或乳酸盐的光学纯度。在能够生产较高浓度游离乳酸的菌株中, 没有一种是L-乳酸或乳酸盐生产菌株。

表5

ATCC乳杆菌属菌株的乳酸或乳酸盐生产

ATCC#	乳杆菌	Lac	% L-乳酸或乳酸盐	pH
12315	德氏乳杆菌乳亚种 (L. delbrueckii lactic)	47	42	4.93
11741	唾液乳杆菌唾液亚种	64	52	4.12
25302	类干酪乳杆菌类干酪亚种 (L. paracasei paracasei)	52	69	4.76
25258	詹氏乳杆菌(L. jensenii)	3	-	6.25
15009	瑞士乳杆菌	66	53	4.03
33409	德氏乳杆菌保加利亚亚种 (L. delbrueckii bulgaricus)	18	54	5.45
25599	类干酪乳杆菌坚韧亚种	66	53	4.04
39392	干酪乳杆菌干酪亚种 (L. casei casei)	50	12	4.71
33323	L. grasseri	18	-	5.62
4536	嗜酸乳杆菌(L. acidophilus)	40	-	5.43
35046	动物乳杆菌(L. animalis)	51	-	4.78

实施例7-纯乳酸或乳酸盐菌株#41的SO_2耐受力

考察了不同的二氧化硫（SO_2）浓度对纯乳酸菌株＃41 的乳酸或乳酸盐生产能力的影响．使用菌株＃41，考察了不同的二氧化硫浓度对乳酸或乳酸盐生产的影响。通过描述于实施例 1 中的标准发酵规程，发酵在补充有 10 vol.% CSL、30 g/L 葡萄糖和 20 g/L $CaCO_3$ 的 MRS 培养基中进行。下面表 6 中所示的结果表明，菌株＃41 能够在高达至少大约 600 ppm 的 SO_2 浓度存在的条件下生产乳酸或乳酸盐。当存在 800 ppm 的 SO_2 时，在所进行的类似的发酵中，菌株＃41 经过一个 144 小时的休眠期后开始生产乳酸或乳酸盐。

表 6

纯乳酸菌株＃41 的 SO_2 耐受力

SO_2 浓度	乳酸或乳酸盐生产（g/L）		
	24 小时	48 小时	72 小时
200ppm	11	48	66
400ppm	9	27	55
600ppm	9	11	43

实施例 8－温度对乳酸或乳酸盐生产的影响

在 41℃至 54℃之间的温度范围内，测定了纯乳酸菌株＃41 的乳酸或乳酸盐产量。发酵在补充有 10 vol.% CSL、60 g/L 葡萄糖和 20 g/L 碳酸钙的培养基 B 中进行。下面表 7 所示的结果证实，菌株# 41 生产乳酸或乳酸盐的最佳温度范围是从 44℃到 54℃。

表 7

乳酸或乳酸盐生产的温度相关性

温度（℃）	乳酸或乳酸盐生产（g/L）		
	24 小时	48 小时	72 小时
41°	14	51	68
44°	25	55	68
47°	26	50	63
50°	31	52	57
54°	9	19	23

实施例 9－浸渍液浓度对乳酸或乳酸盐生产的影响

使用描述于实施例 2 中的许多 L-乳酸或乳酸盐生产菌株进行发酵，以考察生长培养基中不同量的玉米浆对乳酸或乳酸盐生产的影响。发酵在 48℃下、在补充有 50 g/L 葡萄糖、20 g/L $CaCO_3$ 以及 1%、5%或 10%CSL 的培养基 A（见下文）中进行。

培养基 A（pH=5.0）

10 g/L	酵母膏
0.2%	K_2HPO_4
1 g/L	吐温 80
.2%	柠檬酸铵
0.005%	$MnSO_4 4H_2O$
0.02%	$MgSO_4 7H_2O$
	加入的碳源／能量来源
	加入的氮源
	加入的用于调节 pH 的 $CaCO_3$

表 8

浸渍液对乳酸或乳酸盐生产的影响

菌株#	乳酸或乳酸盐生产（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

实施例 10－根据核糖型（ribotype）对纯乳酸菌株的检定

根据核糖印迹模式分析（riboprint pattern analysis）（参见，例如 Jaquet 等人，Zbl. Bakt.，276，356-365 （1992））对分离自玉米浸渍液的许多 L-乳酸或乳酸盐生产纯乳酸细菌菌株进行了分类。该技术的原理，是使用一种 EciRI 限制酶对来自所述菌株的一个单一菌落的 DNA 进行消化，经过在琼脂糖凝胶上的粒析后，使该 DNA 与来自大肠杆菌（*E. coli*）的经化学标记的 rRNA 操纵子进行杂交。所得到的模式是微生物之间遗传关系的直接指标，它已经被用于鉴别四个属的细菌（沙门氏菌（*Samonella*）、李斯忒氏菌（Listeria）、葡萄球菌（Staphylococcus）和大肠杆菌）以及用于对关系很近的革兰氏阳性和革兰氏阴性菌株的分类学鉴别。

分离自玉米浸渍液的七种乳酸或乳酸盐生产菌株的核糖型结果示于图 2 中。给予相同核糖组（RiboGroup）名称的菌株可能被认为为具有相同的分类学水平。示于图 2 中的七种菌株所显示的核糖型，与一种商用实验室计算机数据库中的 30 种不同乳酸细菌菌株中的任何一种的模式都不吻合。在数据库的菌株中，不吻合的是嗜酸乳杆菌、动物乳杆菌、德氏乳杆菌、瑞士乳杆菌、食淀粉乳杆菌和唾液乳杆菌。示于图 2 中的菌株的核糖型还与来自下述菌株的模式不吻合：敏捷乳杆菌（*Lactobacillus*

agilis)、短乳杆菌(*Lactobacillus brevis*)、布氏乳杆菌(*Lactobacillus buchneri*)、融合乳杆菌(*Lactobacillus confusus*)、棒状乳杆菌(*Lactobacillus coryniformis*)、弯曲乳杆菌(*Lactobacillus curvatus*)、香肠乳杆菌(*Lactobacillus farciminis*)、高加索酸奶乳杆菌(*Lactobacillus kefir*)、鼠乳杆菌(*Lactobacillus murinus*)、戊糖乳杆菌(*Lactobacillus pentosus*)、植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)、清酒乳杆菌(*Lactobacillus sake*)以及猪双白乳杆菌(*Lactobacillus suebicus*)。示于图 2 中的核糖型模式还与来自下述菌株的不吻合：格氏乳球菌(*Lactococcus garviae*)、乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)和棉子糖乳球菌(*Lactococcus raffinolactis*)、或者肉色明串珠菌(*Leuconostoc carnosum*)、柠檬明串珠菌(*Leuconostoc citreum*)、肠膜明串珠菌(*Leuconostoc mesenteroides*)、类肠膜明串珠菌(*Leuconostoc paramesenteroides*)、乳酸片球菌(*Pediococcus acidilactici*)、糊精片球菌(*Pediococcus dextrinicus*)和戊糖片球菌(*Pediococcus pentoxaceus*)。

示于图 2 中的七种菌株的核糖型模式属于三种核糖组。其中两种菌株(＃114 和＃119)具有相同的核糖型。这两种菌株中的一种是杂乳酸菌株(＃119)，而另一种是生产外消旋乳酸或乳酸盐的纯乳酸菌株(＃114)。其中的一种 D-乳酸或乳酸盐生产菌株(＃79)显示了与其它六种菌株不同的核糖型模式。剩下的四种菌株(＃90、127、132 和 140)被归类于相同的核糖组中，而且可以被认为可能具有相同的分类学水平，尽管事实上它们的核糖型模式是不同的。在具有 MIL 4-1132 模式的四种菌株中，三种是 L-乳酸或乳酸盐生产菌株(＃90、132 和 140)，而第四种(＃127)生产外消旋乳酸或乳酸盐。

实施例 11－加入的碱对乳酸或乳酸盐生产的影响

考察了加入不同量的 $CaCO_3$ 对纯乳酸菌株＃41 的乳酸或乳酸盐生产的影响。实验在 47℃下、在补充有 8 vol.% CSL、200 g/L 葡萄糖和不同添加量的碳酸钙(30-90 g/L)的培养基 A 中进行。结果示于下面的表 9 中。

表 9

$CaCO_3$ 对乳酸或乳酸盐生产的影响

	乳酸或乳酸盐生产（g/L）				
$CaCO_3$ 浓度	0 小时	24 小时	51 小时	120 小时	最终 pH
30 g/L	3.17	48.1	75.5	75.7	3.98
40 g/L	6.12	53.4	81.3	87.0	4.48
50 g/L	5.84	49.4	83.4	88.1	4.73
60 g/L	3.21	50.2	75.4	77.2	4.75
70 g/L	4.85	48.9	75.3	73.8	4.8
80 g/L	3.45	54.4	61.1	83.6	4.77
90 g/L	5.39	49.6	57.8	83.6	4.74

实施例 12－有 12％CSL、90 g/L 葡萄糖和 33.4 g/L $CaCO_3$ 时菌株＃41 的发酵侧形

图 3 显示了在一个典型的发酵实验过程中，与时间对应的发酵液中的 pH 和有机成分的侧形。显示于图 3 中的侧形基于通过在 47℃下、在补充有 10 vol.％ CSL、100 g/L 葡萄糖和 33.4 g/L 碳酸钙的培养基 B 中培养菌株#41 而得到的结果。

实施例 13－有 90 g/L 葡萄糖、33.4 g/L $CaCO_3$ 和 12％CSL／36％LSW 时菌株＃41 的发酵侧形

图 4 显示了在使用菌株＃41 的典型的发酵实验的过程中，与时间对应的乳酸或乳酸盐产量。该发酵使用描述于实施例 1 中的规程进行。显示于图 4 中的侧形基于通过在 47℃下、在补充有 90 g/L 葡萄糖、33.4 g/L 碳酸钙和 12 vol.％ CSL（36 wt.％干固体）或 36 vol.％ LSW（12 wt.％干固体）的培养基 C 中培养菌株#41 而得到的结果。总结于下面表 10 中的结果显示，最终大约 40 g/L 的游离乳酸浓度与两种玉米浸渍液都无关。由于乳酸或乳酸盐的生产是使用一种 L-乳酸或乳酸盐生产菌株（＃41）

进行的，在上述发酵过程结束时至少存在大约 35 g/L 的游离 L-乳酸（剩余物是存在于所加入的浸渍液中的游离 D-乳酸或乳酸盐）。

表 10

使用菌株＃41 的乳酸或乳酸盐产量

	玉米浸渍液来源	
	12% CSL	36%LSW
乳酸或乳酸盐（g/L）		
0 小时	10.3	8.4
16 小时	44.0	52.4
24 小时	80.5	92.2
44 小时	91.5	96.8
最终 pH	3.92	3.98
最终的游离乳酸或乳酸盐（g/L）	42	41

实施例 14－有 8-12％CSL、 90 g/L 葡萄糖和 36.6 g/L $CaCO_3$ 时菌株＃41 的乳酸或乳酸盐生产

图 5 显示了在使用菌株＃41 的典型的发酵实验过程中，与时间对应的乳酸或乳酸盐产量。该发酵使用经过修正的描述于实施例 1 中的规程进行。使菌株＃41 的细胞在 800 ml 的培养基中预生长，然后将其从培养基中分离。然后使预生长的细胞再悬浮于 800 ml 的新鲜培养基中。显示于图 5 中的侧形基于通过在 47℃下、在补充有 90 g/L 葡萄糖、36.6 g/L 碳酸钙和 8 vol.%CSL（36 wt.%干固体）、12 vol.％CSL、24 vol.%LSW（12 wt.%干固体）或 36 vol.%LSW 的培养基 B 中对预生长细胞的培养而得到的结果。

表 11

使用菌株＃41 的乳酸或乳酸盐产量

玉米浸渍液来源	最终 pH	乳酸或乳酸盐	游离乳酸
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

实施例 15－加入的葡萄糖对乳酸或乳酸盐产量的影响

考察了加入不同量的碳水化合物源（葡萄糖）对纯乳酸菌株＃41 的乳酸或乳酸盐产量的影响。使用描述于实施例 1 中的标准发酵规程，发酵通过在 48℃下、在补充有 10 vol.% CSL、20 g/L $CaCO_3$ 和规程中所示的葡萄糖浓度的培养基 A 中培养菌株#41 来进行。该培养基还含有附加的来自玉米浆的 1-15 g/L 的发酵性糖（主要是葡萄糖和果糖）。结果示于下面的表 12 中。本实验的结果显示，至少对于所加入的碱的浓度（20 g/L $CaCO_3$）而言，通过至少大约 50 g/L 的诸如葡萄糖的碳水化合物源的加入，乳酸或乳酸盐生产能力可以被提高。

表 X1

葡萄糖对乳酸或乳酸盐产量的影响

	乳酸或乳酸盐产量（g/L）		
加入的葡萄糖	24 小时	48 小时	72 小时
30 g/L	14	39	42
50 g/L	11	51	55
80 g/L	11	50	67
100 g/L	9	47	65

对本发明的描述参考了各种特定的和优选的实施方案和技术。但是，

不能将本发明视为仅限于在本说明书中公开的特定的实施方案。应理解的是，可以进行许多变化和修改而仍保留在本发明的主旨和范围之中。

表 1

所分离的纯乳酸菌株

菌株号	g/L 乳酸或乳酸盐	pH	%L-乳酸或乳酸盐
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

表1（续）

所分离的纯乳酸或乳酸盐菌株

菌株号	g/L 乳酸或乳酸盐	pH	%L-乳酸或乳酸盐
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

表1（续）

所分离的纯乳酸或乳酸盐菌株

菌株号	g/L 乳酸或乳酸盐	pH	%L-乳酸或乳酸盐
66			4
67			5
68			5
69			49
70			48
71			44
72			5
73			5
74			5
75			3
76	53.27		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

图 1

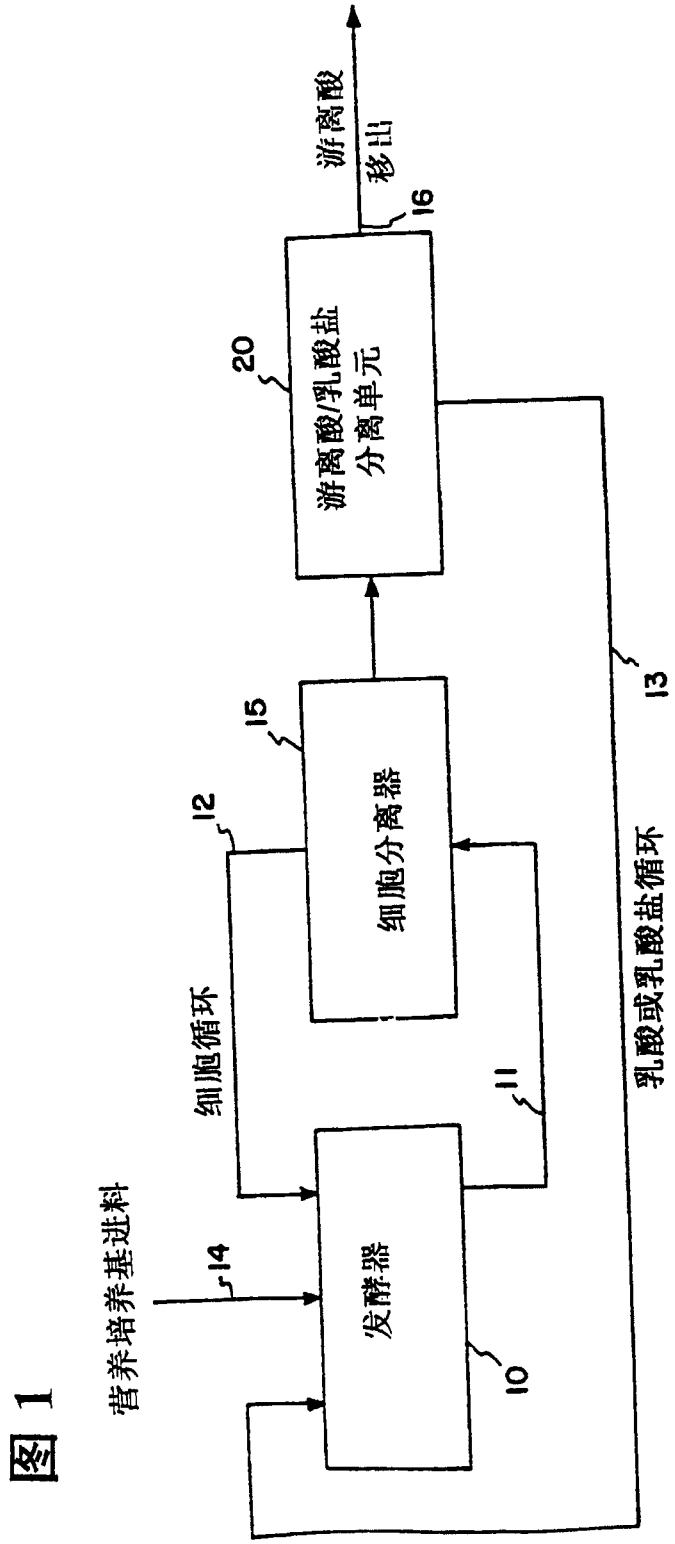
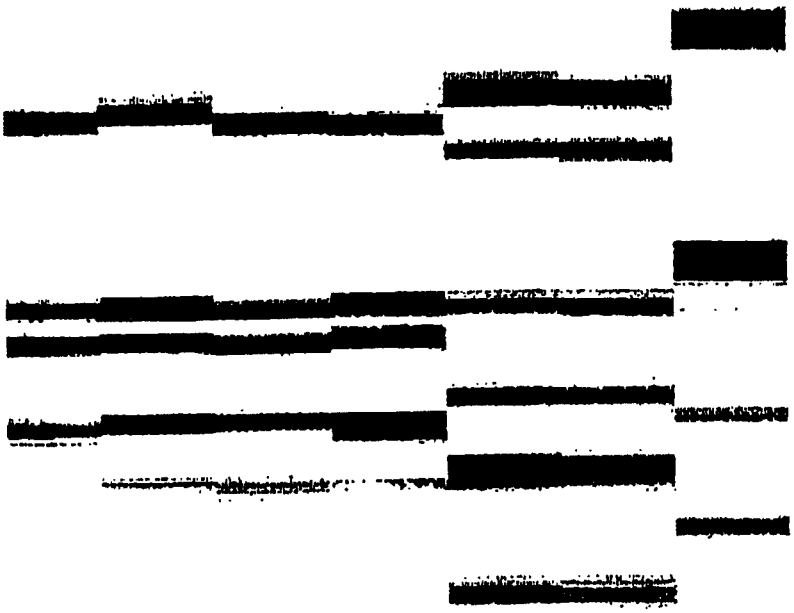

营养培养基进料
14
发酵器
10
细胞循环
12
11
15
细胞分离器
20
游离酸/乳酸盐
分离单元
游离酸
移出
16
乳酸或乳酸盐循环
13

图 2



核糖组	菌株#
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

图 3

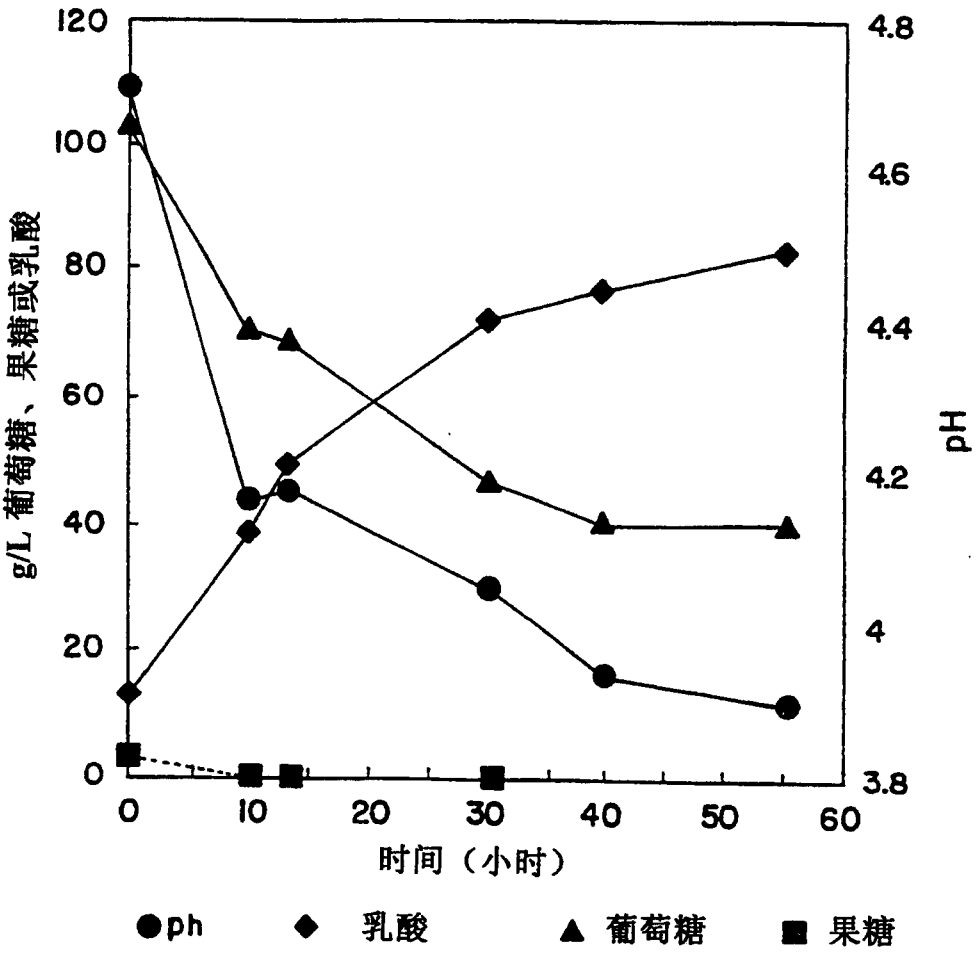

120
100
80
60
40
20
0
g/L 葡萄糖、果糖或乳酸
4.8
4.6
4.4
4.2
4
3.8
pH
0
10
20
30
40
50
60
时间（小时）
●ph
◆ 乳酸
▲ 葡萄糖
■ 果糖

图 4

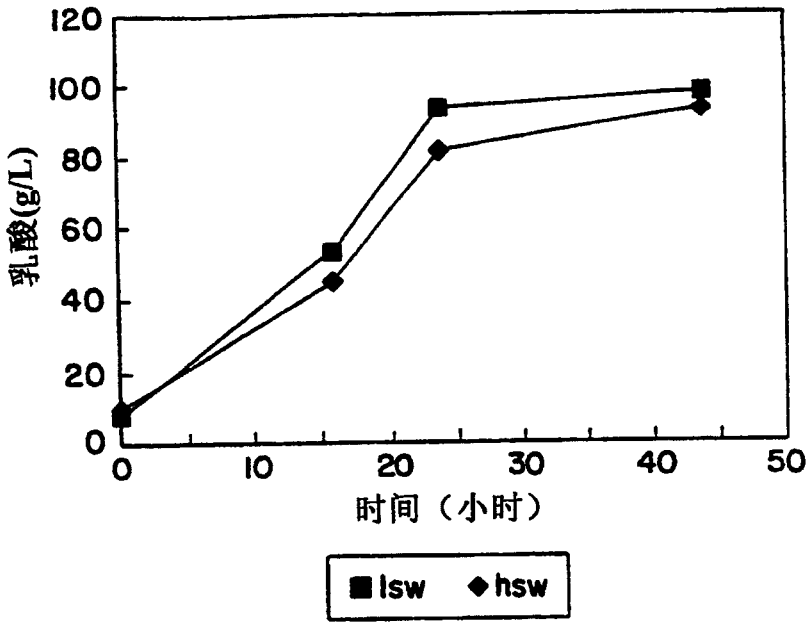


图 5

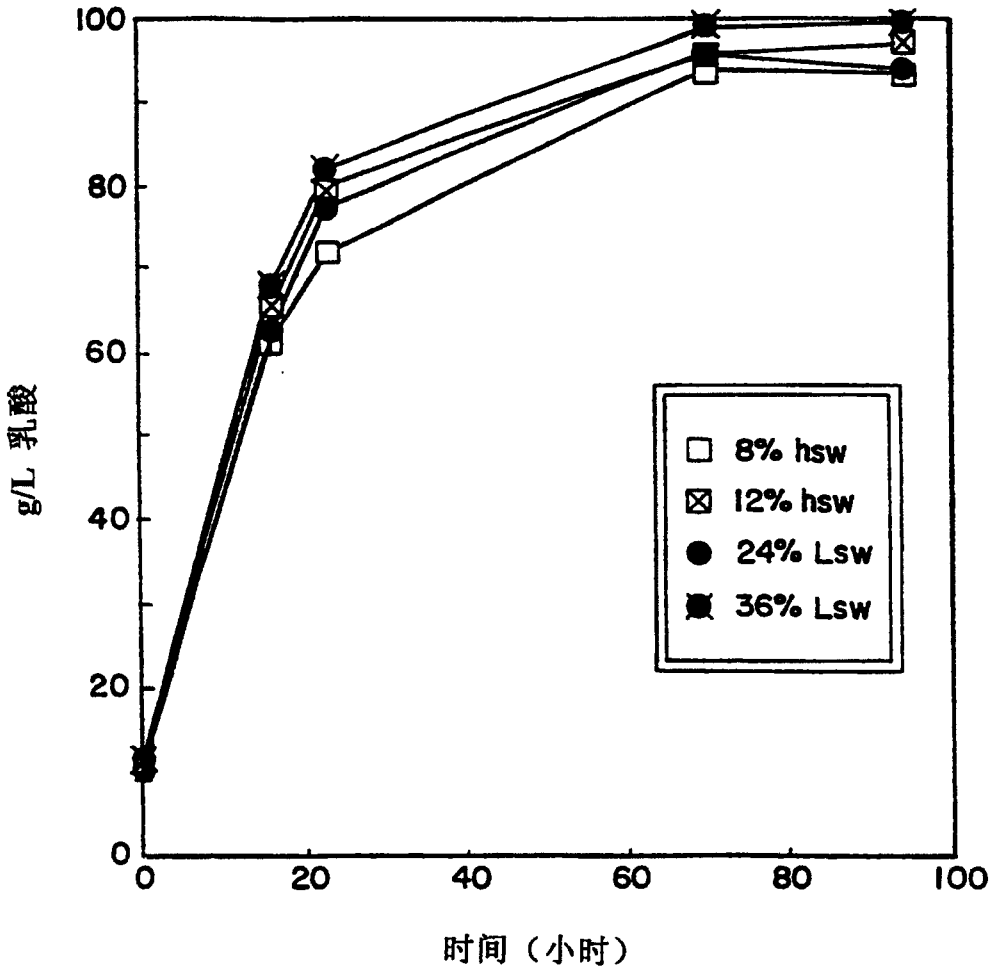

100
80
60
40
20
0
g/L 乳酸
0
20
40
60
80
100
时间（小时）
8% hsw
12% hsw
24% Lsw
36% Lsw

图 6

