



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1735691 B

(45) 授权公告日 2010.05.26

(21) 申请号 03817295.X

C12P 7/00 (2006.01)

(22) 申请日 2003.05.30

C12P 7/56 (2006.01)

(30) 优先权数据

60/384,333 2002.05.30 US

(56) 对比文件

Catherine Hack et al. The Use of
Oxygen Uptake Rate to Optimise Air Feed
Rate to a Continuous Ethanol Fermentation.
Prehrambeno-tehnol. biotehnol. rev. 32
4. 1994, 32(4), 187-190.

(85) PCT申请进入国家阶段日

2005.01.19

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2003/016825 2003.05.30

审查员 孔佳音

(87) PCT申请的公布数据

W02003/102200 EN 2003.12.11

(73) 专利权人 卡吉尔道有限责任公司

地址 美国明尼苏达州

(72) 发明人 P·万霍伊克 A·阿里斯蒂杜

B·拉什

(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 11038

代理人 程泳

(51) Int. Cl.

C12P 1/00 (2006.01)

C12P 1/02 (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 9 页 附图 1 页

(54) 发明名称

利用比氧吸收率作为过程控制的发酵方法

(57) 摘要

在发酵方法中用比氧吸收率 (OUR) 作为过程控制参数。至少在发酵过程的生产阶段测定 OUR, 调节过程参数使 OUR 保持在希望的范围之内。当使用含有已经破坏而不再起作用的天然 PDC 途径的微生物进行发酵时, 本发明特别适用。这类微生物在严格厌氧条件下通常生产较差。通过监测 OUR 控制的微需氧条件可使微生物的表现得到优化。

1. 一种发酵方法,其中微生物发酵发酵底物,在发酵过程的生产阶段监测比氧吸收率,并且根据测得的比氧吸收率控制至少一个操作参数,其中溶解氧浓度保持在不到饱和量的1%,其中所述微生物是一种天然 PDC 途径已经破坏的基因工程化酵母。

2. 权利要求1的方法,其中操作参数是选自通气率、搅拌速度和通气气体组成中的一个或多个。

3. 权利要求2的方法,其中所述微生物具有至少一种功能外源基因,该基因使细胞能够产生希望的发酵产物。

4. 权利要求3的方法,其中所述外源基因是乳酸脱氢酶基因。

5. 权利要求4的方法,其中所述微生物属于假丝酵母属或克鲁维酵母属。

6. 一种在发酵培养基中进行发酵过程的方法,该培养基含有发酵微生物,和可被该微生物发酵的底物,其中所述微生物属于 PDC 途径已经破坏的、具有至少一种功能外源基因的克鲁维酵母或假丝酵母属,且前述功能性外源基因使得该细胞能够产生希望的发酵产物;其中所述发酵液含有一定量的溶解氧(DO),这种发酵显示一定的比氧吸收率(OUR),该方法包括:

a) 在发酵的生产阶段测定 OUR;

b) 调节通气条件,使得在发酵的生产阶段,OUR 保持在预定的范围内,而 DO 保持在不到饱和的1%,其中步骤b)中的 OUR 保持在 $0.8-3.0 \text{ mmol O}_2/\text{gdw/h}$ 的范围内,DO 保持在不到 $10 \mu \text{mol O}_2/\text{L}$ 。

7. 权利要求6的方法,其中所述微生物是一种显示克莱布特里阴性表型的酵母细胞。

8. 权利要求6的方法,其中所述外源基因是乳酸脱氢酶基因。

9. 权利要求6的方法,其中所述底物选自己糖。

10. 权利要求9的方法,其中所述己糖选自葡萄糖。

利用比氧吸收率作为过程控制的发酵方法

[0001] 发明背景

[0002] 本申请要求对 2002 年 5 月 30 提交的美国临时申请号 60/384,333 的优先权。

[0003] 本发明得到了美国政府的支持,合同号为 DE-FC-36-00G010598,由能源部资助。美国政府在本发明中有一定的权利。

[0004] 乳酸具有广泛的工业适用性,包括在化学加工和合成、化妆品、制药、塑料和食品生产中的用途。大多数工业规模的生产乳酸的方法是发酵法。这些发酵方法中使用不同的产乳酸细菌。

[0005] 最近的研究探索了重组酵母株在乳酸发酵方法中的用途。重组酵母与细菌发酵相比可能有几个优点。一些酵母株更能耐受较高的温度。这可能允许更高温度的发酵,这可以翻译成更快的发酵速度。对高温的更好的耐受性能够使清除发酵培养基的污染微生物变得更加容易,因为能够简单地将培养基加热到不希望的种死亡而希望的种能够耐受的温度。产乳酸细菌,如乳酸杆菌 (*Lactobacilli*),其高效生产需要一种复杂的发酵培养基。发酵培养基的复杂性增加了原料的成本,并且使得从培养基中分离乳酸更加困难和昂贵。使用重组酵母,通过使用一种简化发酵培养基,提供了降低成本的可能性。

[0006] Porro 及同事构建了一种产乳酸酵母,构建方法是将一种外源 LDH(乳酸脱氢酶)基因插入来自酿酒酵母 (*S. cerevisiae*)、乳酸克鲁维酵母 (*K. lactis*)、*T. delbrueckii* 和 *Z. bailii* 种的酵母细胞内,破坏细胞的天然丙酮酸途径。参见 Porro 等人,“用于生产乳酸的代谢工程酿酒酵母细胞的研发”, *Biotechnol. Prog.* 1995 May-Jun;11(3):294-8; Porro 等人,“为了由工程酵母大规模生产乳酸,一种代谢途径的替换”, *App. Environ. Microbiol.* 1999 Sep;65(9):4211-5; Bianchi 等人,“用异源 LDH 基因转化的丙酮酸利用缺陷的乳酸克鲁维酵母株的高效同型乳酸发酵”, *App. Environ. Microbiol.* 2001 Dec;67(12):5621-5。Porro 能够生产一种产乳酸的重组酵母,但是该菌株的表现几乎不足以在任何工业化生产过程中使用。为了获准在工业环境中使用,该菌株必须有良好的乳酸收率(即底物向乳酸的高转化率)和高生产力(即底物向乳酸的快速代谢)。该酵母优选地能够耐受含有高滴度乳酸的培养基。

[0007] 最近, Rajgarhia 及同事生产了比 Porro 的酵母显示更高收率和生产力的重组酵母。参见,例如 WO 00/71738、WO 02/42471 和 PCT/US02/16223。如 WO00/71738 所述的 Rajgarhia 的工作试图利用某些酵母种显示的所谓的“Crabtree 阴性”表型。Crabtree 效应被定义为:当以高比生长速率培养(长期效应)或高浓度葡萄糖存在下培养(短期效应)时,由于微生物氧消耗的抑制,在有氧条件下发生发酵性代谢。Crabtree 阴性表型不显示这种效应,因此甚至在高浓度葡萄糖存在下或者以高生长速度生长也能够消耗氧气。因此,通过供氧的操作, Crabtree 阴性微生物的培养物至少在理论上能够从生长阶段转变为发酵(生产)阶段。当有明显通气时,微生物生长产生生物质和 CO₂,而在厌氧条件下,细胞变为发酵可以利用的底物,产生乳酸或其它发酵产物。

[0008] 然而我们发现,在严格厌氧条件下,某些菌株不象希望的一样有效地发酵。例如,对于丙酮酸脱羧酶 (PDC) 途径缺失或破坏的工程酵母株,事实如此。然而,在乳酸发酵(以

及希望的产物不是乙醇的其它发酵)中使用这些工程种是非常希望的,因为 PDC 途径的破坏减少了产生的乙醇的量。因此,希望提供一种改良的发酵方法,其中在严格厌氧条件下不能有效发酵的菌株能够经济地产生希望的发酵产物。

附图说明

[0009] 图 1 是一张图,说明对于一种基因修饰的马克斯克鲁维酵母 (*K. marxianus*) 种,OUR 对葡萄糖消耗、乳酸产生和收率的影响。

[0010] 图 2 是一张图,说明对于另外一种基因修饰的马克斯克鲁维酵母种,OUR 对葡萄糖消耗、乳酸产生和收率的影响。

发明内容

[0011] 一方面,本发明是一个发酵方法,其中在该发酵过程的生产阶段监测比氧吸收率,根据测定的氧吸收率控制至少一个操作参数。

[0012] 另一方面,本发明是在一种发酵培养基中进行发酵过程的方法,该培养基含有发酵微生物、可被该微生物发酵的底物,这种发酵在发酵期间显示一定量的溶解氧 (DO) 和比氧吸收率 (OUR),该方法包括:

[0013] a) 在发酵的生产阶段测定 OUR;

[0014] b) 调节通气条件,使得在发酵的生产阶段,OUR 保持在预定的范围内,而 DO 保持不到饱和量的 1%。

[0015] 第三方面,本发明是一种方法,其包括:

[0016] a) 测定一种发酵微生物将碳水化合物发酵为希望的发酵产物时 OUR 值的最佳范围;

[0017] b) 在含有细胞能够代谢的碳水化合物和一种或多种养分的培养基中培养该微生物,对该培养基通气,使得细胞生长并繁殖,培养基中的 (DO) 减少为不到饱和量的 1%,细胞显示至少 $10\text{mmol O}_2/\text{克细胞干重/小时}$ ($\text{mmol O}_2/\text{gdw/h}$) 的比氧吸收率;然后

[0018] c) 在发酵条件下,包括在足以使培养物的比氧吸收率 (OUR) 处于最佳范围内的微需氧条件下,在缓冲培养基中培养该微生物。

[0019] 另一方面,本发明是一种发酵方法,其包括:

[0020] a) 在含有细胞能够代谢的碳水化合物的培养基中培养工程化酵母细胞,该细胞具有破坏的 PDC 途径和可使该细胞产生希望的发酵产物的外源基因,对该培养基通气,使得细胞生长并繁殖,培养基中溶解氧的量减少为不到饱和的 1%,细胞显示至少 $10\text{mmol O}_2/\text{克细胞干重/小时}$ ($\text{mmol O}_2/\text{gdw/h}$) 的比氧吸收率;然后

[0021] b) 在发酵条件下,包括在足以使培养物的比氧吸收率 (OUR) 为约 0.8- 约 $3.0\text{mmol O}_2/\text{gdw/h}$ 的微需氧条件下,在缓冲培养基中培养该细胞。

[0022] 令人惊讶的是,利用氧吸收率作为过程控制参数的微需氧条件可以使发酵过程得到优化,平衡希望的发酵产物的高收率与良好的生产率。能够利用 OUR 测定建立并控制发酵过程的某些参数,以便在发酵过程的生产阶段保持最佳条件。

[0023] OUR 是每单位时间每单位生产的微生物干重的耗氧率 (O_2)。由每单位时间消耗的氧气量,并由此期间的细胞质量方便地计算出 OUR。通过测量每单位时间向发酵容器中供应

以及从中排出的氧气量方便地得出耗氧量。然后将耗氧量除以培养液中生物质的质量(干重)获得 OUR。生物质的重量可如下测量:采样,测定细胞浓度(w/v),乘以培养液总体积。供氧量能够通过监测通气率直接测量。发酵容器排出的氧气量能够用多种分析方法测量,其中质谱法特别有用。供应的氧与排出的氧之差是细胞消耗的量。将耗氧量除以细胞干重,并除以单位时间,计算出 OUR。适当地以 $\text{mmol O}_2/\text{克细胞(干重)}/\text{小时}$ 的单位表示。

[0024] 在最普通的方面,本发明包括在发酵的生产阶段测定 OUR,以及根据测得的 OUR 值控制至少一个发酵参数。根据测得的 OUR 控制的参数一般与发酵培养液的通气有关,如通气率、搅拌速率、通气气体的组成成分(例如提高或降低气体中的氧浓度)或影响培养液中微生物的耗氧率的其它参数。

[0025] 在本发明的一个优选方面,发酵细胞在多种通气条件下培养,根据经验确定具体细胞型的 OUR 的最佳范围。OUR 的最佳范围通常考虑几个因素,其中有三个可能是极为重要的:由发酵底物产生希望的发酵产物的收率(通常以克产物/消耗的克底物表示),希望的发酵产物的比生产率(通常以产物重量/干细胞重量/单位时间表示),和底物消耗率(通常以消耗的底物重量/单位时间表示)。在同一通气条件下,这些因素通常不会全是最优化的。例如,底物消耗率有时随 OUR 的升高而升高,但是收率趋于下降,由此平衡了较快的生产率与较高的收率损失,并且损害了该方法的总体经济性。OUR 值最佳范围的确定通常包括平衡速率与收率,以优化该方法的总体经济性。一旦确定希望的 OUR 值范围,即选择发酵生产阶段的发酵条件,以确定并使 OUR 保持在该范围内。如前所述,在该过程中测定 OUR,并控制一个或多个发酵参数,使 OUR 保持在该范围内。

[0026] 在该生产阶段,溶解氧的浓度大约保持在零,这反映了细胞消耗氧的条件,其速率与溶解于发酵培养液中的速率大致相同。生产阶段溶解氧的浓度通常不到饱和量(即在使用的气体和压力条件下能够溶解于培养液中的最大量)的 1%。一般而言,不到约 $10 \mu\text{mol/L}$,更优选地不到约 $5 \mu\text{mol/L}$ 的溶解氧含量是合适的。最优选地,溶解氧含量基本为零。方便地用含有透气膜的氧电极(Clark 电极)测量溶解氧,如 Ingold 生产的和 B Braun 所售,货号为 33182418 或 33182400。对于本发明,溶解氧含量低于仪器检测限度时的操作(如这些所述)被认为反映溶解氧浓度约为零。

[0027] 在本发明的一个特别优选的方面,在不同的生长和生产条件下培养微生物。在生长阶段,该微生物需氧生长。这些细胞在一种培养基中生长,该培养基含有水,和在生长和生产阶段细胞都能够代谢的碳水化合物,以及如下文更全面地描述的不同养分。选择通气条件,使得(1)细胞显示至少 $10 \text{mmol O}_2/\text{gdw/h}$ 的比氧吸收率(OUR), (2) 在生长阶段结束时,培养基中溶解氧(DO)的浓度减少至不到饱和量的 1%,而 OUR 保持在至少 $10 \text{mmol O}_2/\text{gdw/h}$ 。OUR 优选地至少为 $15 \text{mmol O}_2/\text{gdw/h}$,更优选地至少为 $18 \text{mmol O}_2/\text{gdw/h}$ 。在生长阶段中,OUR 最优选地高至细胞能够产生的水平。因此最大 OUR 一定程度上取决于使用的具体工程酵母细胞。通常,预计最大 OUR 为约 $20\text{--}30 \text{mmol O}_2/\text{gdw/h}$ 。具有 PDC 破坏和外源 LDH 基因的马克斯克鲁维酵母细胞趋于显示约 $20\text{--}22 \text{mmol O}_2/\text{gdw/h}$ 的最大 OUR。

[0028] 在生产阶段的大部分时间里,DO 可以是并且优选地是大于零,只要在该阶段结束时它降至接近零。因此,在生长阶段的大部分时间里,特别是在细胞经历指数生长的期间,可以向培养基内导入比保持需要的 OUR 所需过量的氧气。随着细胞繁殖和生物质积累,生长阶段的总氧吸收率也提高,保持恒定 OUR 所需的氧气总量将提高。然而,因为在生长阶段

结束前 DO 可能是积极的,进行通气的一种优选方法是在生长阶段开始时和指数期期间供应比所需过量的氧气。由于生物质积累,细胞消耗的总氧量增加到供应的氧气与细胞消耗的氧气非常匹配的量,结果 DO 下降。因此在生长阶段能够采用不变的通气条件,如果选择这些条件使得当产生希望的量的生物质时,DO 下降为零,并且有需要的 OUR。此外,在生长阶段通气条件也可能变化,只要在生长阶段结束时 OUR 保持并且 DO 接近零。

[0029] 一旦 DO 下降到接近零,并且产生希望的量的生物质,优选地在转换到生产阶段之前使这些通气条件 (OUR 至少为 $10\text{mmol O}_2/\text{gdw/h}$, DO 等于 0) 保持一段时间。适当的时间是约 15 分钟-2 小时,优选的时间是约 30-90 分钟。最优选的时间是约 45-75 分钟。如果该生物太快地转换到生产阶段,则细胞倾向于表现较差的生产率。如果这些通气条件保持太长,则细胞倾向于表现出较差的希望的发酵产物收率以及较差的生产率。

[0030] 通过改变通气条件使培养转换到生产阶段。在生产阶段,选择微需氧条件,使 OUR 保持在如上所述的预定范围之内。为了促进总体细胞生活力和健康,一些微生物似乎需要代谢少量氧气。这些生物的例子包括具有 PDC 破坏的基因工程化酵母,特别是具有外源基因的酵母,该外源基因使它们能够产生一种具体的发酵产物。在完全厌氧条件下,这些细胞显示的底物消耗率和发酵产物产量通常极低。另外,希望的发酵产物的收率也遭受损失。在微需氧条件下,在取决于具体菌株的某些 OUR 值时,细胞能够更快速地代谢底物。这导致底物消耗率和希望的发酵产物的产量提高。然而,当耗氧量升高超过某一数值时,希望的产物的收率下降,因为很多底物被转化为二氧化碳。另外,当 OUR 升高超过某一数值时,生产率趋于平缓,甚至下降,因此生产率提高不能补偿收率的损失。因此,在生产阶段使 OUR 保持在特定范围内可使其达到经济上最佳的收率与生产率的平衡。

[0031] OUR 的最佳值一定程度上取决于具体的生物,但是 OUR 范围通常为约 $0.8\text{--}3\text{mmol O}_2/\text{gdw/h}$ 。一种具体生物的最佳 OUR 值可根据经验容易地确定。OUR 范围的一个优选的下限是约 $1.0\text{mmol O}_2/\text{gdw/h}$,更优选地约 $1.2\text{mmol O}_2/\text{gdw/h}$ 。OUR 范围的一个优选的上限是约 $2.5\text{mmol O}_2/\text{gdw/h}$,更优选地约 $2.0\text{mmol O}_2/\text{gdw/h}$ 。

[0032] 培养物显示的 OUR 主要取决于微生物本身和通气条件。通气条件影响溶解于培养基中、从而可被该生物利用的氧气的量。对于一种指定生物,以下情况有助于提高 OUR:(1) 提高供氧率,和 (2) 小氧气泡的形成(以提高氧分子向液相的物质传递)。通过喷射和/或搅拌容易实现小气泡的形成。

[0033] 生长阶段通气率的例子有至少约 0.2 的空气体积/发酵培养基体积/分钟(vvm),优选地约 0.3-约 2vvm,更优选地约 0.4-约 1vvm。在生产阶段,约 0.01-约 0.1vvm,优选地约 0.02-约 0.75vvm,特别是约 0.02-约 0.5vvm 的体积通常是合适的。如果用氧气作为通气气体,体积将成比例减少。通气优选地在促进小气泡形成的条件(如喷射)下进行。优选地持续搅拌,特别是当希望获得高 OUR 值时。一般而言,为了获得希望的 OUR,同时选择通气率和搅拌条件。

[0034] 当发酵产物是一种酸时,在生产阶段缓冲该培养基,使其 pH 保持在约 5.0-约 9.0,优选地约 5.5-约 7.0。适当的缓冲剂是可中和形成的乳酸的碱性物质,包括,例如:氢氧化钙、碳酸钙、氢氧化钠、氢氧化钾、碳酸钾、碳酸钠、碳酸铵、氨、氢氧化铵等。常规发酵方法中使用的缓冲剂在此通常也是合适的。

[0035] 其它发酵条件,如温度、细胞密度、底物选择、养分选择等,被认为对于本发明而言

不是关键的,通常选择它们以提供一种经济的方法。生长阶段和生产阶段的温度可以从培养基的冷冻温度以上至约 50℃,但是最佳温度一定程度上取决于具体的微生物。优选的温度,特别是在生产阶段,是约 30-45℃。当细胞是一种工程马克斯克鲁维酵母时,它能够耐受相对高温(如 40℃以上,可达 50℃,特别是可达 45℃)。另一个优选细胞种是 *C. sonorensis*,能够耐受可达约 40℃的温度。该温度范围提供了在较高温度下进行发酵的可能性(从而降低了冷却成本),而没有明显的生产率损失。良好的高温耐受的另一个优点是,如果发酵被一种不希望的微生物污染,则在许多情况下,能够通过加热发酵培养基到 40℃或以上,特别是 45℃或以上,选择性地杀死这种不希望的微生物,而不会明显损伤本发明希望的细胞。

[0036] 在生产阶段,发酵培养基中的细胞浓度一般是约 1-150,优选地约 3-10,更优选地约 3-6 克干细胞 / 升发酵培养基。

[0037] 使用的具体碳水化合物取决于具体的宿主细胞,以及该宿主细胞是否已经工程改造成可将任何具体碳水化合物代谢为丙酮酸。优选己糖,如葡萄糖、果糖、葡萄糖寡聚体,如麦芽糖、异麦芽糖、麦芽三糖、淀粉和麦芽糊精。对于寡聚糖,为了将其消化为单体糖,可能必须向发酵培养液中加入酶。适当的戊糖的一个例子是木糖。葡萄糖是最优选的。

[0038] 在缓冲发酵中,酸性发酵产物(如乳酸)被中和,它们形成相应的乳酸盐。因此酸的回收包括再生游离酸。这一般如下进行:除去细胞,用一种强酸(如硫酸)酸化发酵培养液。形成一种盐副产物(当一种钙盐作为中和剂且硫酸作为酸化剂时,是石膏),将其与酸分离。然后通过如液液抽提、蒸馏、吸附等技术回收酸,如 T.B. Vickroy,《生物技术综述 (Comprehensive Biotechnology)》(M. Moo-Young 编著),第三卷,第 38 章, Pergamon, Oxford, 1985 ;R. Datta 等人, FEMS Microbiol. Rev., 1995 ;16 :221-231 ;美国专利号 4, 275, 234、4, 771, 001、5, 132, 456、5, 420, 304、5, 510, 526、5, 641, 406 和 5, 831, 122, 以及国际专利申请号 WO 93/00440 所述。

[0039] 该培养基一般含有具体细胞所需的养分,包括氮源(如氨基酸、蛋白质、无机氮源,如氨或铵盐,等等),和多种维生素、矿物质等。

[0040] 本发明的方法能够连续、分批进行或者所述方式的一些组合。

[0041] 本发明的方法中使用的微生物是以下任何一种微生物:其(1)可将碳水化合物发酵为希望的发酵产物,(2)在微需氧条件下比在严格厌氧条件下更有效地发酵。特别重要的细胞是某些基因工程化酵母细胞,其特征具有:(1)破坏的 PDC 途径,和(2)至少一种功能外源基因,该基因使细胞能够产生希望的发酵产物。这些合适的工程酵母细胞在下列文献中描述,例如:Porro 等人,“用于生产乳酸的代谢工程酿酒酵母细胞的研发”, Biotechnol. Prog. 1995 May-Jun ;11(3):294-8 ;Porro 等人,“为了由工程酵母大规模生产乳酸,一种代谢途径的替换”, App. Environ. Microbiol. 1999 Sep ;65(9):4211-5 ;Bianchi 等人,“用异源 LDH 基因转化的丙酮酸利用缺陷的乳酸克鲁维酵母株的高效同型乳酸发酵”, App. Environ. Microbiol. 2001 Dec ;67(12):5621-5 ;WO 00/71738、WO02/42471、PCT/US02/16223 和 2002 年 5 月 30 日提交的美国临时申请号 60/384,333。优选地该细胞也显示 Crabtree 阴性表型,以便在通气条件下在高浓度葡萄糖存在下以高比生长速率呼吸并生长。

[0042] “破坏的”是指天然 PDC 途径已经改变,使得 PDC 途径的功能至少减少 90%。破

坏可以如下实现：改变该途径（或者与该途径有关的一个或多个基因），使其功能减少或消失，或者去除该途径起作用所需的一个或多个基因。一种优选的细胞存在 PDC 基因的缺失。

[0043] 一种优选的外源基因是乳酸脱氢酶 (LDH) 基因。该基因优选地整合到细胞基因组内。工程化酵母细胞可能含有一个拷贝或多个拷贝的外源 LDH 基因。它可能含有两个或多个不同的外源 LDH 基因。在一个特别优选的实施方案中，该基因整合到细胞基因组内已经缺失的天然 PDC 基因处。在特别优选的实施方案中，LDH 基因位于有效启动和终止序列的功能控制下，该序列与该细胞天然的启动和终止序列（特别是 PDC 启动和终止序列）至少 90% 同源。这些优选的和特别优选的细胞在 2002 年 5 月 30 日提交的美国临时申请号 60/384,333 中更全面地描述，在此引用作为参考。

[0044] 瑞士乳杆菌 (*Lactobacillus helveticus*)、乳酸片球菌 (*Pediococcus acidolactici*)、干酪乳杆菌 (*Lactobacillus casei*)、*Kluyveromyces thermotolerans*、戴尔有孢圆酵母 (*Torulaspora delbrueckii*)、粟酒裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*)、巨大芽孢杆菌 (*B. megaterium*) 是含有适当的 L-乳酸脱氢酶基因的菌株，它们能够克隆以用于生产工程化酵母。两种优选的 L-乳酸脱氢酶基因是瑞士乳杆菌和巨大芽孢杆菌 L-乳酸脱氢酶。瑞士乳杆菌、约氏乳杆菌 (*Lactobacillus johnsonii*)、德氏乳杆菌保加利亚亚种 (*Lactobacillus bulgaricus*)、德氏乳杆菌 (*Lactobacillus delbrueckii*)、植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) 和戊糖乳杆菌 (*Lactobacillus pentosus*) 是含有适当的 D-乳酸脱氢酶的菌株，它们能够克隆以用于工程化酵母。一种优选的 D-乳酸脱氢酶是瑞士乳杆菌 D-乳酸脱氢酶。

[0045] 为了商业使用，工程化细胞应当显示几个特征。该酵母应当能够将相当比例的碳水化合物转化为希望的发酵产物（即产生高收率的产物）。它应当显示高比生产率，即每单位时间每细胞重量产生大量发酵产物。优选地该细胞也耐受高浓度的发酵产物。这最后一个特性可以允许该发酵方法使用高浓度的起始碳水化合物。

[0046] 通常希望本发明的发酵方法具有下列特征中的一部分或全部：

[0047] A. 收率至少为每克底物 30，优选地至少 40，更优选地至少 60，更优选地至少 75 克发酵产物。希望的理论收率是 100%，但是收率的实际极限约为 98%。

[0048] B. 比生产率至少为 0.1，优选地至少 0.3，更优选地至少约 0.4，特别是至少约 0.5 克发酵产物 / 克细胞 / 小时。比生产率希望尽可能的高。

[0049] C. 滴度（发酵产物的最大浓度）至少为 15 克 / 升发酵培养基，优选地至少 20g/L，更优选地至少 40g/L，再更优选地至少 80g/L，可达 150g/L，优选地可达约 120g/L。对于乳酸，发酵培养基的温度略微影响易于获得的滴度的上限，因为高度浓缩的乳酸溶液（即高于约 150g/l）在约 35℃ 以下时倾向于成为极粘稠的或凝胶。使用较高的发酵温度，例如约 35-50℃，可以获得更高的滴度，而不会凝胶化或有不当的粘性发生 (build-up)。

[0050] 另外，本发明的发酵方法优选地达到高体积生产率 (volume productivity)。体积生产率表示为每单位时间每单位体积发酵培养基产生的产物量，一般是克产物 / 升培养基 / 小时。至少 1.5g/L/ 小时，优选地至少 2.0g/L/ 小时，更优选地至少 2.5g/L/ 小时的体积生产率是希望的。在可达 3-6 克细胞 / 升发酵培养基的优选细胞密度时，最大生产率倾向于可达约 5.0g/L/ 小时，更一般地可达约 4.0g/L/ 小时。非常优选的是进行发酵，使得当培养基 pH、温度或这两者处于上段所述范围内时，达到这些体积生产率。

[0051] 根据本发明产生的乳酸可用于生产丙交酯,即两个乳酸分子组成的一种环酯。根据乳酸的立体异构体不同,丙交酯可以是 D- 丙交酯(由两个 D- 乳酸分子组成)、L- 丙交酯(由两个 L- 乳酸分子组成)或 D-L- 丙交酯(由每种 L- 乳酸和 D- 乳酸分子之一组成)。由乳酸生产丙交酯的一种适当的方法是通过聚合/解聚方法,如授予 Gruber 等人的 USP 5,142,023 所述。

[0052] 丙交酯又特别可以用作生产聚交酯聚合物(PLA)和共聚物的单体。制备这些聚合物的方法在授予 Gruber 等人的 USP 5,142,023 中也有描述。优选的 PLA 产物是如授予 Gruber 等人的 USP 5,338,822 所述的融解稳定的聚合物。PLA 可以是半晶体或非晶体的。

[0053] 下列实施例用来说明本发明的某些实施方案,并非限制其范围或精神。除非另外说明,所有份数和百分比都是根据重量。

[0054] 实施例 1

[0055] 一种工程酵母细胞,被称为 CD 587,其接种原液在一个 250ml 摇瓶中制备,瓶中含有 100ml CaCO_3 缓冲的(42g/l)酵母提取物(10g/l)-蛋白胨(20g/l)培养基,以及 100g/l 葡萄糖。在 $\text{OD}_{600} = 10$ 时,离心收集细胞,随后将其重悬浮于 15% (w/v) 甘油溶液中,以 1.5mL 等份贮存于 -80°C 。

[0056] 细胞 CD 587 是一种马克斯克鲁维酵母细胞,其 PDC 基因已经缺失,一种外源瑞士乳杆菌 D-LDH 基因整合到其基因组内缺失 PDC 基因的位点处,受天然 PDC 启动和终止序列的控制。细胞 CD 587 及其制备在 2002 年 5 月 30 日提交的美国临时申请号 60/384,333 中更全面地描述。

[0057] 通过用一份 1.5mL 甘油原液接种 3L 发酵罐,开始生长阶段,使初始 $\text{OD}_{600} = 0.05$ 。通过以 800 转/分的恒定搅拌速度以 1.5L/min(0.5vvm) 的流速连续喷射空气,生长阶段需氧进行。继续培养,直到 DO 减少至空气饱和的 5%。这符合废气中恒定的 CO_2 浓度。通过监测供应的空气量并利用质谱法分析废气中的氧,测定 OUR。在生长阶段,OUR 约为 $20.8 \pm 2.5 \text{ mmol O}_2/\text{gdw/小时}$ 。在这些条件下,OUR 受细胞代谢可以利用的氧的能力所限制。最终的细胞密度约为 4g/L。

[0058] 一旦 DO 达到零,通气条件即保持 1 小时,之后开始生产阶段。通过将气流速度瞬时转换为 0.1L/min(0.033vvm),并降低搅拌速度至 500 转/分,开始生产阶段。通气条件的这种改变使生产阶段的 $\text{OUR} = 1.5 \pm 0.1 \text{ mmol O}_2/\text{gdw/小时}$, $\text{DO} = 0$ 。继续发酵约 60 小时。定期采样进行 HPLC/IC/GC-MS 分析,测定葡萄糖消耗率、乳酸盐产率和乳酸盐收率。生产阶段的结果如表 1 所示。

[0059] 表 1

[0060]

最大乳酸滴度	$106 \pm 3.1 \text{ g/kg}$
葡萄糖消耗率	$1.2 \pm 0.05 \text{ g/gdw/h}$
乳酸生产率	$1.1 \pm 0.04 \text{ g/gdw/h}$
乳酸收率(生产阶段)	$0.92 \pm 0.03 \text{ 克乳酸 / 克葡萄糖}$

最大乳酸滴度	106 ± 3.1 g/kg
%回收的碳（生产阶段）	99% ± 3.0
乳酸的光学纯度	> 99.9

[0061] 该实施例重复数次,在生产阶段改变通气条件,以使连续实验中的 OUR 值达到约 1.2、2.2、2.8、3.0 和 3.2。结果在图 1 中显示。如图 1 所示,随着 OUR 在 1.2-3.0 范围内升高,收率（曲线 1）稳定是显著地下降,在 OUR 为 3.2 时在进一步显著降低之前可见升高（可能且反常地）。当氧气越来越多地可以利用时,这种收率的降低与细胞呼吸的增强一致。在 1.2-约 2.2 的 OUR 范围内乳酸盐生产率（曲线 3）略微升高,然后在 OUR 升高到 2.8 时在升高之前下降。然而,在 OUR 值为 3 或更高时,由于收率损失增加,提高生产率的好处丧失。当 OUR 由 1.2 升高到 2.8 时,葡萄糖利用率（曲线 2）略微升高,在 OUR 高于 3.0 时,由于快速细胞呼吸,其大大提高。图 2 的数据提示,对于该菌株,最佳 OUR 值处于约 0.8-2.2 的范围内,特别是约 1.0-约 1.5。

[0062] 实施例 2

[0063] 使用一种被称为 CD 558 的菌株重复实施例 1 数次。CD 558 株是一种马克斯克鲁维酵母细胞,其 PDC 基因已经缺失。它含有随机整合到其基因组内的一种外源瑞士乳杆菌 D-LDH 基因。该 LDH 基因在一个酿酒酵母 PGK-1 启动子和酿酒酵母 Gal-10 终止序列的控制之下。在每次实验中,生长阶段的 OUR 约为 20.5 mmol O₂/gdw/小时。为了改变 OUR,通过控制喷射和搅拌速度,生产阶段的通气条件在不同实验之间不同。不同实验的 OUR 值约为 0.6、1.4、1.7 和 2.2。在 OUR 为 1.7 的生产阶段,结果如表 2 所示:

[0064] 表 2

[0065]

最大乳酸滴度	111g/kg
葡萄糖消耗率	0.94g/gdw/h
乳酸生产率	0.83g/gdw/h
乳酸收率（生产阶段）	0.89 克乳酸 / 克葡萄糖
%回收的碳（生产阶段）	95.6
乳酸的光学纯度	> 99.9

[0066] 图 2 说明改变 OUR 如何影响生产率和收率。对于该菌株,乳酸收率（曲线 1）显示对 0.7-2.2 范围内的 OUR 的极强依赖性,当 OUR 约为 1.4 时达到最大值。乳酸盐生产率（曲线 3）类似地在该 OUR 值时达到峰值。葡萄糖消耗率（曲线 2）升高,直到 OUR 约为 2.2,然后变平。对于该菌株,图 2 的数据提示最佳 OUR 为约 1-约 1.7,特别是约 1.2-1.5。

[0067] 实施例 3

[0068] 实施例 1 重复三次。第一次实验 (3A) 如实施例 1 所述进行,不同之处在于生产阶

段的 OUR 是 $2.1 \text{ mmol O}_2/\text{gdw/h}$ 。在第二次实验中 (3B), 当生长阶段的 DO 达到零时, 立即将培养转换到生产阶段。在与实施例 3A 相同的通气条件下, OUR 为 $1.8 \text{ mmol O}_2/\text{gdw/h}$ 。在第三次实验中 (3C), 在 DO 达到零之后, 在生长阶段结束时继续通气 1.5 小时以上, 在与实施例 3A 相同的通气条件下, 生产阶段的 OUR 为 $1.4 \text{ mmol O}_2/\text{gdw/h}$ 。结果总结于表 3 中。

[0069] 表 3

[0070]

性质	实施例号		
	3A	3B	3C
保持时间, DO=0	1 小时	0	>1.5 小时
OUR, 生产阶段(mmol/gdw/h)	2.1	1.8	1.4
最大乳酸滴度(g/kg)	112.3	84	94
葡萄糖消耗率(g/gdw/h)	1.22	1.06	0.40
乳酸生产率(g/gdw/h)	1.20	0.93	0.32
乳酸收率(生产阶段, g/g)	0.89	0.84	0.79
%回收的碳(生产阶段)	105	104.3	98
光学纯度(%)	>99.9	>99.9	>99.9

[0071] 在生产过程中在指定通气条件下, OUR 是微生物代谢活性的一个指标。当保持时间为零或者超过 1.5 小时 (相对于 1 小时保持时间之后) 时 OUR 降低, 这表明该微生物在这些条件下不是很好地起作用。这也反映在葡萄糖消耗、乳酸盐产量和收率的下降。

[0072] 实施例 4

[0073] 使用补充 160 g/l 葡萄糖的缓冲 ($\text{pH } 5.5$) 无机培养基, 酵母细胞 CD587 的接种原液在一个 14 升实验室生物反应器中需氧培养。在以 5 升 / 分钟的速度搅拌下通过喷射空气进行通气。最初生长阶段的 DO 开始时为 100%, 在循环过程中降至 20%。OUR 保持在约 $20 \text{ mmol O}_2/\text{gdw/h}$ 。当 $\text{OD}_{600} = 10$ 时, 将 4 升培养液转移到一个 240 升的生产规模的发酵罐中, 其中含有另外 220 升补充了 170 g/l 葡萄糖的培养基。该细胞进一步在 42°C 、 $\text{pH } 5.5$ 及需氧条件下生长约 8 小时。在此期间, DO 由初始值 100 降为零。通过以 15 升 / 分钟通气, 使 OUR 保持在 $20 \text{ mmol O}_2/\text{gdw/h}$ 。培养物在 $\text{DO} = 0$ 的情况下保持 1 小时。然后通过减少通气, 使 OUR 为 $1.5\text{--}1.7 \text{ mmol O}_2/\text{gdw/h}$, 将培养物转换到生产阶段。根据需要添加另外一种缓冲剂 ($\text{Ca}(\text{OH})_2$), 使 pH 保持在 5.5 ± 0.1 。在生产阶段 DO 保持在 0%。葡萄糖在 30 小时内耗尽, 得到乳酸盐滴度为 114 g/kg 。生长阶段的平均比葡萄糖消耗率为 $1.1 \text{ g/g DW} \cdot \text{h}^{-1}$ 。平均比乳酸生产率为 $0.8 \text{ g/g DW} \cdot \text{h}^{-1}$, 生产率为 0.76 克乳酸 / 克葡萄糖, 总收率 (包括生长阶段) 为 0.67 克乳酸 / 克葡萄糖。

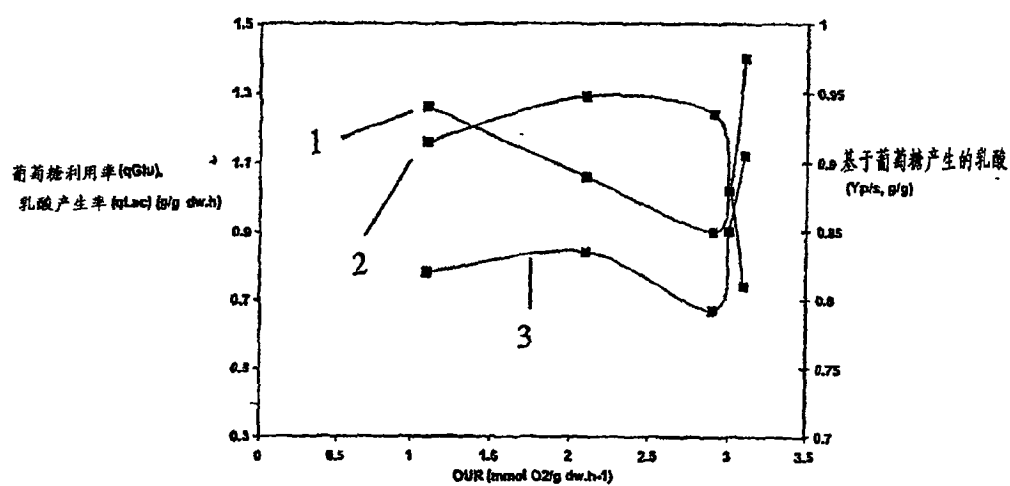


图 1

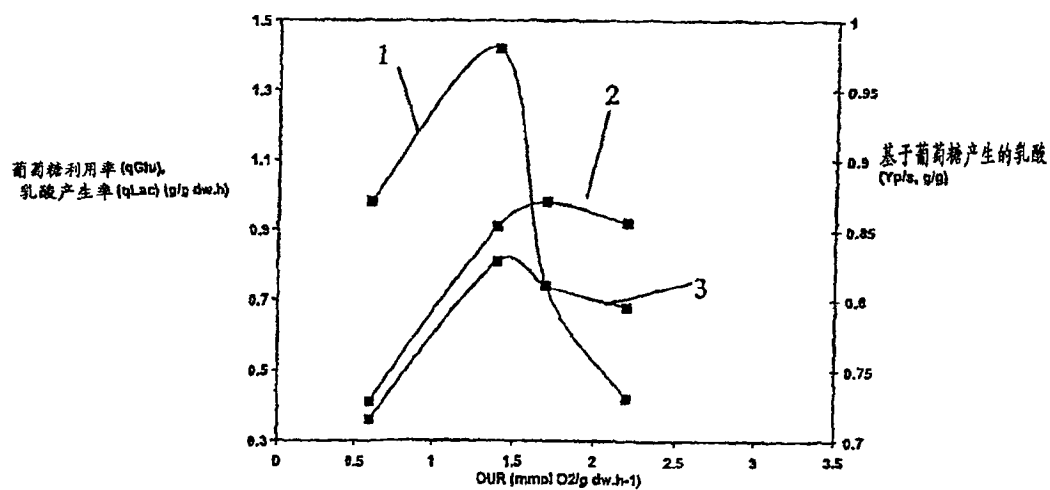


图 2