



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0132864
(43) 공개일자 2018년12월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12P 7/56 (2006.01)

(52) CPC특허분류
C12P 7/56 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-7032667

(22) 출원일자(국제) 2017년04월10일

심사청구일자 2018년11월09일

(85) 번역문제출일자 2018년11월09일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2017/058547

(87) 국제공개번호 WO 2017/178426

국제공개일자 2017년10월19일

(30) 우선권주장

16164820.9 2016년04월12일
유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인

푸락 바이오캡 비.브이.

네덜란드, 엔엘-4206 에이씨 고린캠, 아르켈세디이크 46

(72) 발명자

칼바센카 알리악세이

네덜란드 4206 에이씨 고린캠 아르켈세디이크 46
푸락 바이오캡 비브이 아이피 디파트먼트 내

보코베 제로엔

네덜란드 4206 에이씨 고린캠 아르켈세디이크 46
푸락 바이오캡 비브이 아이피 디파트먼트 내

(74) 대리인

김진희, 김태홍

전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 **락트산마그네슘 발효 방법**

(57) 요약

본 발명은 탄소 공급원으로부터 락트산마그네슘을 제조하기 위한 발효 방법으로서,

- 발효 가능한 탄소 공급원을 포함하는 발효 배지를 발효 반응기에 제공하는 단계,
- 알칼리성 마그네슘 염의 존재 하에 락트산 생성 미생물을 이용하여 발효 배지를 발효시켜 락트산마그네슘을 포함하는 발효 브로스를 제공하는 단계, 및
- 락트산마그네슘 함유 발효 브로스로부터 고체 락트산마그네슘을 회수하는 단계를 포함하고,

발효 공정의 작업 시간의 적어도 40% 동안, 발효 브로스 중 고체 락트산마그네슘의 농도는 전체 발효 브로스에 대한 고체 락트산마그네슘 결정으로서 계산하여 5-40 부피% 범위로 유지되는,

탄소 공급원으로부터 락트산마그네슘을 제조하기 위한 발효 방법에 관한 것이다.

본 발명의 방법은 효율적인 생성물 분리와 조합하여 높은 생산도에서 안정한 작업을 가능하게 한다.

명세서

청구범위

청구항 1

탄소 공급원으로부터 락트산마그네슘을 제조하기 위한 발효 방법으로서,

- 발효 가능한 탄소 공급원을 포함하는 발효 배지를 발효 반응기에 제공하는 단계,
- 알칼리성 마그네슘 염의 존재 하에 락트산 생성 미생물을 이용하여 발효 배지를 발효시켜 락트산마그네슘을 포함하는 발효 브로스를 제공하는 단계, 및
- 락트산마그네슘 함유 발효 브로스로부터 고체 락트산마그네슘을 회수하는 단계

를 포함하고,

발효 공정의 작업 시간의 적어도 40% 동안, 발효 브로스 중 고체 락트산마그네슘의 농도는 전체 발효 브로스에 대한 고체 락트산마그네슘 결정으로서 계산하여 5-40 부피% 범위로 유지되는, 탄소 공급원으로부터 락트산마그네슘을 제조하기 위한 발효 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 발효 브로스 중 고체 락트산마그네슘의 농도는 작업 시간의 규정된 부분 동안 5-35 부피% 범위 내, 특히 10-30 부피% 범위 내, 일부 실시양태에서 10-25 부피% 범위 내인 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 발효 브로스 중 고체 락트산마그네슘의 농도는 작업 시간의 규정된 부분 동안 15-40 부피% 범위 내, 특히 15-35 부피% 범위 내, 보다 특히 15-30 부피% 범위 내, 일부 실시양태에서 15-25 부피% 범위 내인 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 발효 브로스 중 고체 락트산마그네슘의 농도는 작업 시간의 규정된 부분 동안 20-40 부피% 범위 내, 특히 20-35 부피% 범위 내, 보다 특히 20-30 부피% 범위 내, 일부 실시양태에서 20-25 부피% 범위 내인 방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 하나의 항에 있어서, 발효 공정의 작업 시간의 적어도 60% 동안, 바람직하게는 작업 시간의 적어도 70% 동안, 보다 바람직하게는 작업 시간의 적어도 80% 동안, 일부 경우 작업 시간의 적어도 90% 동안, 발효 브로스 중 고체 락트산마그네슘의 농도는 규정된 범위 내에서 유지되는 것인 방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 하나의 항에 있어서, 발효 공정이 회분 공정, 유가 공정 또는 연속 공정인 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 발효 공정이 고체 락트산마그네슘의 농도가 작업 시간의 적어도 70% 동안, 바람직하게는 작업 시간의 적어도 80% 동안, 보다 바람직하게는 작업 시간의 적어도 90% 동안 규정된 범위 내로 유지되는 연속 공정인 방법.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 하나의 항에 있어서, 락트산마그네슘을 발효 브로스로부터 회수하는 단계는 고체 락트산마그네슘을 포함하는 발효 브로스를 발효 반응기로부터 회수하는 단계 및 고체 락트산마그네슘을 발효 브로스로부터 수거하는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 고체 락트산마그네슘이 수거된 발효 브로스를 발효 반응기로 재순환시키는 것인 방법.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 하나의 항에 있어서, 락트산마그네슘을 발효 브로스로부터 회수하는 단계는 간헐적 방식으로 불연속 단계로 수행되는 것인 방법.

청구항 11

제1항 내지 제9항 중 어느 하나의 항에 있어서, 락트산마그네슘을 발효 브로스로부터 회수하는 단계는 연속 방식으로 수행되는 것인 방법.

청구항 12

제1항 내지 제5항 중 어느 하나의 항에 있어서, 발효 공정은 연속 발효 공정이고, 락트산마그네슘을 발효 브로스로부터 회수하는 단계는 연속 방식으로 수행되며, 고체 락트산마그네슘의 농도는 작업 시간의 적어도 70% 동안, 바람직하게는 작업 시간의 적어도 80% 동안, 보다 바람직하게는 작업 시간의 적어도 90% 동안 규정된 범위 내로 유지되는 것이 바람직한 것인 방법.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 하나의 항에 있어서, 락트산마그네슘은 정제 단계, 예를 들어 재결정화 단계로 처리되어 정제된 락트산마그네슘을 생성하는 것인 방법.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 하나의 항에 있어서, 락트산마그네슘은 예를 들어 이온 교환법 또는 산성화를 통해 락트산으로 전환되고, 산성화 후에 산성화 단계 중에 형성된 마그네슘 염으로부터 락트산을 분리하는 분리 단계, 예를 들어 임의로 정제 단계 또는 농축 단계 중 하나 이상으로 처리될 수 있는 락트산 수용액을 생성하는 분리 단계가 뒤따르는 것인 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 락트산은 하나 이상의 정제 단계, 예를 들어 정제된 락트산을 형성하는 증류 단계, 고체 결정질 물질로서 락트산을 형성하는 결정화 단계, 또는 락트산 올리고머를 형성하는 올리고머화 단계로 처리되거나, 락티드로 전환되거나, 또는 직접 또는 락티드를 통해 폴리락트산으로 전환되는 것인 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 발효를 통한 락트산마그네슘의 제조에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 락트산마그네슘은 다수의 용도를 가지며, 그중 하나는 락트산의 원료 물질이다. 락트산은 식품의 저장 및 생분해성 폴리머의 제조와 같은 다수의 용도에서 사용될 수 있다. 이러한 용도 중 일부에서 출발 락트산의 품질이 가장 중요하다. 예를 들어, 락티드 및 폴리락트산의 제조에서, 높은 입체화학적 순도를 갖는 락트산으로 출발하는 것이 바람직하다. 추가로, 출발 락트산 내 불순물의 존재는 락트산 모이어티의 바람직하지 않은 라세미화를 야기하여 보다 저품질의 폴리락트산 생성물 및 락티드를 야기할 수 있다.

[0003] 상품 시장과 양립할 수 있는 제조 비용을 달성해야 하는 필요성과 더불어 고품질의 제품에 대해 증가하는 수요는, 품질을 손상시키지 않는 동시에 락트산 제조를 위한 출발 물질의 비용을 감소시킬 수 있는 것을 필수적이게 만든다.

[0004] 락트산은 주로 미생물에 의한 탄수화물의 발효를 통해 제조된다. 반응 배지의 pH를 미생물이 잘 자라는 값으로 유지하기 위해, 알칼리 염이 주로 발효 중에 첨가되어, 락트산 형성으로 인한 pH의 감소를 보충한다. 이는 락테

이트 염의 형성을 유도한다. 알칼리성 마그네슘 염, 예를 들어 마그네슘의 (수)산화물 또는 탄산염이 이용되는 경우, 락트산마그네슘이 형성될 것이다.

- [0005] 락트산마그네슘 발효로 또한 기재되는 락트산마그네슘이 형성되는 발효 방법은 당해 분야에 공지되어 있다.
- [0006] 예를 들어, NL288829에서는 발효 중에 마그네슘 염 또는 아연 염이 첨가되어 발효 배지로부터 수거되는 불용성 락트산마그네슘 또는 락트산아연을 형성하는 락트산 제조를 위한 연속 발효 방법이 기재되어 있다.
- [0007] US2010/0323416에서는 또한 마그네슘 첨가가 있는 카르복실산을 형성하기 위한 발효 방법이 기재되어 있다.
- [0008] WO2013160352에서는 다수의 다른 생성물들 중에서도 락트산마그네슘의 제조를 위한 발효 방법이 기재되어 있다. 상기 방법은 습식 사이클론을 포함하는 고체 생성물 수거 단계 및 고체/액체 분리 단계를 포함한다.
- [0009] 문헌[Yong Wang et al., Efficient magnesium lactate production with in situ product removal by crystallization, BioResource Technology, Vol. 198, 26- September 2015, pp. 658-663]에서는 락트산마그네슘이 발효 중에 수거되는 락트산마그네슘 발효가 기재되어 있다. 발효 중의 고체 생성물의 수거는 140 g/l의 락트산마그네슘 농도에서 수행되어야 함이 나타나 있다. 140 g/l의 락트산마그네슘 농도는 42℃에서 5 부피%의 결정 농도에 상응한다. 이 문헌의 도 3에서 발효 중 생성물 농도는 발효 동안 70 g/l 내지 150 g/l로 유지된다(70 g/l의 값이 얻어지기 전에 25시간 동안 시동 기간 있음). 결정 형성이 110 g/l의 농도에서 시작되기 때문에, 이는 발효의 실질적 부분에 있어서 고체 결정이 전혀 존재하지 않거나 저농도로만 존재함을 의미한다.
- [0010] 생성물 품질을 저해시키지 않으면서 비용을 감소시킬 수 있는 락트산용 공급원의 목표를 달성하기 위해서, 효율적인 생성물 분리와 함께 높은 생산성에서 안정적인 작업이 가능하게 하는 락트산마그네슘 발효 방법에 대한 필요가 당해 분야에 존재한다. 본 발명은 이러한 방법을 제공한다.

발명의 내용

- [0011] 본 발명은 탄소 공급원으로부터 락트산마그네슘을 제조하기 위한 발효 방법으로서,
- [0012] - 발효 가능한 탄소 공급원을 포함하는 발효 배지를 발효 반응기에 제공하는 단계,
- [0013] - 알칼리성 마그네슘 염의 존재 하에 락트산 생성 미생물을 이용하여 발효 배지를 발효시켜 락트산마그네슘을 포함하는 발효 브로스를 제공하는 단계, 및
- [0014] - 락트산마그네슘 함유 발효 브로스로부터 고체 락트산마그네슘을 회수하는 단계
- [0015] 를 포함하고,
- [0016] 발효 공정의 작업 시간의 적어도 40% 동안, 발효 브로스 중 고체 락트산마그네슘의 농도는 전체 발효 브로스에 대한 고체 락트산마그네슘 결정으로서 계산하여 5-40 부피% 범위로 유지되는, 탄소 공급원으로부터 락트산마그네슘을 제조하기 위한 발효 방법에 관한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0017] 발효 브로스 중 고체 락트산마그네슘의 농도를 작업 시간의 적어도 40% 동안 5-40 부피% 범위로 유지하는 것을 보장함으로써, 높은 수율과 효율적인 생성물 분리 특성이 조합된 방법이 얻어진다는 것이 밝혀졌다. 효율적인 생성물 분리 특성은 우수한 공정 안정성뿐만 아니라 또한 높은 생성물 품질로 연결되는데, 이는 상기 특성이 오염물질로부터 락트산마그네슘의 우수한 분리를 가능하게 하기 때문이다.
- [0018] 보다 구체적으로, 고체 락트산마그네슘의 농도가 공정의 상당 부분 동안 너무 높은 경우 공정의 생산성이 감소한다는 것이 밝혀졌다. 이론에 구속되지 바라지 않지만, 이는 예를 들어 시스템 중의 물 활성화에 영향을 미치고/미치거나 미생물에 어떻게든 영향을 미치는 것에 의해 발효 공정에 어떻게든 영향을 미치는 락트산마그네슘 발효 생성물의 존재에 의해 일어날 수 있다고 여겨진다. 이는 고체 발효 생성물이 발효에 영향을 미치지 않는다고 교시하는 기존의 지식과는 대조된다.
- [0019] 다른 한편으로, 공정의 실질적인 부분 동안 락트산마그네슘 농도가 너무 낮은 경우 발효 브로스로부터 고체 락트산마그네슘의 분리가 더 어렵다는 것이 밝혀졌다.
- [0020] 발효 브로스 중 고체 락트산마그네슘의 농도가 적어도 10 부피%인 것이 바람직할 수 있으며, 이는, 보다 높은 농도의 고체 락트산마그네슘이, 생성물을 세척하기 더 용이하게 하는 개선된 여과 특성을 비롯한 개선된 특성을

갖는 생성물을 유도한다는 것이 밝혀졌기 때문이다. 발효 브로스 중 고체 락트산마그네슘의 농도가 작업 시간의 규정된 부분 동안 10-35 부피% 범위 내, 특히 10-30 부피% 범위 내, 일부 실시양태에서 10-25 부피% 범위 내인 것이 바람직할 수 있다. 발효 브로스 중 고체 락트산마그네슘이 작업 시간의 규정된 부분 동안 15-40 부피%, 특히 15-35 부피% 범위 내, 보다 특히 15-30 부피% 범위 내, 일부 실시양태에서 15-25 부피% 범위 내인 것이 보다 바람직할 수 있다. 일부 실시양태에서 발효 브로스 중 고체 락트산마그네슘의 농도가 작업 시간의 규정된 부분 동안 20-40 부피%, 특히 20-35 부피% 범위 내, 보다 특히 20-30 부피% 범위 내, 일부 실시양태에서 20-25 부피% 범위 내인 것이 바람직할 수 있다.

- [0021] 발효 브로스 중 고체 락트산마그네슘의 농도는 하기 절차에 따라 측정된다: 에펜도르프 튜브를 이용하여 발효 브로스로부터 1 ml 균질 샘플을 취한다. 샘플을 1300 rpm에서 2분간 원심 분리한다. 고체 층의 부피 백분율을 시각적으로 결정한다.
- [0022] 상기 고체 층은 고체 락트산마그네슘 및 바이오매스 둘 모두를 포함한다. 바이오 매스의 양을 보충하기 위해, 바이오 매스의 양은 당해 기술분야에 공지된 방법에 의해, 예를 들어 KOH로 pH 8로 조정된 0.5N EDTA 용액 중 5 부피%로 결정이 희석되어 수거된 발효 브로스 샘플의 600 nm에서의 광학 밀도를 결정하고 이를 표준 바이오매스 용액의 OD600nm과 비교하는 것에 의해 별도로 결정될 수 있다.
- [0023] 이후 고체 락트산마그네슘의 부피 백분율은 상기 기재된 원심분리 절차에서 얻은 백분율로부터 바이오매스의 부피 백분율을 차감해 결정할 수 있다.
- [0024] 발효 공정의 작업 시간의 시작점은 모든 배지 성분이 반응기에 제공되고, 발효 배지가 발효 조건, 예컨대 선택된 pH 및 온도로 이행되며, 미생물이 반응기에 제공된 시점이다. 상기 시점에서 발효가 시작되기 위한 모든 조건이 충족된다.
- [0025] 발효 공정의 작업 시간의 종료점은 생성물 형성이 실질적으로 중단된 때, 즉 g/l.h. 단위의 제조가 공정 중에 g/l.h 단위의 제조의 최대 값의 10% 미만인 때의 시점이다. 이는 일반적으로 탄소 공급원이 고갈된 때일 것이다.
- [0026] 본 발명에 따른 방법의 총 작업 시간은 넓은 범위에서 달라질 수 있다. 상업적 작업에 대해서 적합한 최소 작업 시간은 10시간이다. 작업 시간이 상기 값보다 짧을 경우, 락트산마그네슘의 농도가 규정된 범위 내의 동안인 기간(단위는 시간)이 너무 짧아 유의미한 상업적 작업이 달성되기 어려울 수 있을 것이다. 본 발명에 따른 방법의 총 작업 시간이 적어도 24시간, 특히 적어도 48시간인 것이 바람직할 수 있다. 최대 시간 값은 중요하지 않다. 본원의 다른 부분에 기재된 바와 같이, 연속 공정의 경우 총 작업 시간은 이론적으로 무기한일 수 있다. 2년의 값이 일반적인 최대치로 언급될 수 있다.
- [0027] 발효 브로스 중 고체 락트산마그네슘의 농도는 일반적으로 전체 작업 시간 동안 규정된 부피% 범위 내가 아닐 것이다. 예를 들어, 발효 시작시, 배지에는 락트산마그네슘이 존재하지 않을 수 있다. 발효 시동에 따라, 락트산마그네슘이 형성되고, 이는 처음에 용해된 상태일 수 있다. 더 많은 락트산마그네슘이 형성되면서, 발효 배지는 락트산마그네슘으로 포화되고, 고체 락트산마그네슘 결정이 형성되기 시작할 것이다. 이후 10 부피%의 값에 도달하는 데 약간의 시간이 걸릴 것이다.
- [0028] 다른 한편으로, 발효의 종료 근처에서, 탄소 공급원의 제공이 중단되는 경우, 추가적인 생성물 수거 없이 발효를 계속하는 것이 바람직할 수 있으며, 이는 발효 브로스 중 고체 락트산마그네슘의 농도가 40 부피% 초과가 되게 할 수 있다. 추가로, 특히 생성물 수거가 간헐적인 경우, 고체 락트산마그네슘의 농도가 일부 시점에서 공정 중에 40 부피% 초과에 도달할 수 있다.
- [0029] 따라서, 고체 락트산마그네슘의 농도가 상기 명시된 범위 내에서 유지되는 동안의 작업 시간의 백분율은 상기 기재된 시동기와 종료기 사이의 기간과 관련하여 이러한 시동기 및 종료기에 의해 취해지는 시간의 양에 따른다. 그러므로, 작업 시간이 길수록, 고체 락트산마그네슘의 농도가 규정된 범위 내인 작업 시간의 백분율이 더 높을 수 있다.
- [0030] 발효 공정의 작업 시간의 적어도 60% 동안, 바람직하게는 작업 시간의 적어도 70% 동안, 보다 바람직하게는 작업 시간의 적어도 80% 동안, 일부 경우 작업 시간의 적어도 90% 동안, 발효 브로스 중 고체 락트산마그네슘의 농도가 규정된 범위 내에서 유지되는 것이 바람직하다.
- [0031] 본 발명에 따른 방법은 회분 공정, 유가 공정 또는 연속 공정일 수 있다.
- [0032] 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 발효 공정은 회분 공정이다. 본 명세서에서 회분 공정은, 탄소 공급원이 반응

의 시작시 발효 반응기에 제공되며 (실질적 분량의) 탄소 공급원이 공정 중에 제공되지 않는 것인 공정으로 정의된다.

- [0033] 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 발효 공정은 유가 공정이다. 본 명세서에서 유가 공정은, 적어도 탄소 공급원이 반응의 시작시 및 반응 중에 발효 반응기에 제공되며, 예를 들어 불순물의 축적으로 인해 발효가 지속될 수 없는 선결정된 종점을 가지는 공정이다.
- [0034] 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 발효 공정은 연속 발효 공정이다. 본 명세서의 문맥에서 연속 발효 공정은, 적어도 탄소 공급원이 반응의 시작시 및 반응 중에 발효 반응기에 제공되며, 선결정된 종점을 갖지 않는 것인 공정이다. 일반적으로, 발효 배지의 총 부피는 거의 일정하게 유지된다. 이는, 발효 배지의 부피에서의 증가를 야기하는 발효 중의 탄소 공급원의 첨가의 관점에서, 내용물이, 이 경우 고체 락트산마그네슘의 형태로, 임의로 일부 액체 발효 배지와 함께 발효 중에 수거될 것임을 의미한다. 이론적으로, 연속 발효는 무한히 가동될 수 있지만, 유닛 유지보수를 위해 어느 시점에서 중단될 것이다. 회분 발효, 유가 발효 및 연속 발효의 개념은 당업자에게 공지되어 있다.
- [0035] 통상적으로 회분 발효 및 유가 발효에서, 발효는 발효가 중단될 정도로 탄소 공급원이 고갈되기까지 계속된다. 발효 브로스 중 락트산마그네슘의 농도는 탄소 공급원의 양에 의해 결정되며, 전체 발효 브로스에 대해 계산하여 약 50 부피%와 같은 매우 높은 값으로 증가될 수 있다. 이러한 매우 높은 농도는 락트산마그네슘이 고체 형태로 존재하기 때문에 얻어질 수 있다.
- [0036] 하지만, 본 발명에서, 공정은 고체 락트산마그네슘의 농도가 작업 시간의 명시된 부분 동안 규정된 범위로 유지되는 방식으로 발효 브로스로부터 고체 락트산마그네슘의 적절한 회수에 의해 수행될 수 있다.
- [0037] 본 발명의 한 실시양태에서, 발효 공정은 연속 발효 공정이다. 연속 발효 공정에서 탄소 공급원 및 다른 화합물은 발효 공정 중에 첨가되어, 공정이 원칙적으로 무한히 가동될 수 있게 한다. 연속 발효 공정에서, 간헐적 생성물 수거가 수행되어 발효가 지속되도록 반응 용기에서 충분한 공간이 확보되게 할 것이다. 문헌에 기재된 락트산마그네슘 발효에서, 예를 들어 NL288829에서는 생성물 수거가 수행되는 발효 브로스 중 락트산마그네슘 농도에 대한 정보가 제공되지 않는다. 대조적으로, 본 발명에서, 예상과는 달리, 고체 락트산마그네슘 농도를 작업 시간의 명시된 부분 동안 명시된 범위 내에 유지함으로써, 우수한 분리 특성을 나타내는 생성물을 높은 부피적 생산성과 조합하는 발효 공정이 얻어진다는 것이 밝혀졌다. 연속 발효의 사용은 본 발명의 바람직한 실시양태이며, 특히 고체 락트산마그네슘의 농도가 작업 시간의 적어도 70% 동안, 보다 바람직하게는 작업 시간의 적어도 80% 동안, 여전히 보다 바람직하게는 작업 시간의 적어도 90% 동안 규정된 범위 내로 유지되는 경우 그러하다.
- [0038] 발효 브로스 중 고체 락트산마그네슘의 농도는 이로부터 고체 락트산마그네슘을 회수함으로써 조절된다.
- [0039] 고체 락트산마그네슘의 회수는 일반적으로 공정 중에 수행될 것이다. 이는 당해 기술분야에 공지된 방식으로, 예를 들어 발효 반응기로부터 고체 락트산마그네슘을 포함하는 발효 브로스를 회수하고 발효 브로스로부터 고체 락트산마그네슘을 수거하는 단계에 의해 수행될 수 있다. 발효 브로스로부터 고체 락트산마그네슘의 수거는 당해 분야에 공지된 방법에 의해, 예를 들어 여과, 원심 분리, 디캔테이션, 또는 이들의 조합을 통해 수행될 수 있다.
- [0040] 한 실시양태에서 고체 락트산마그네슘이 수거된 발효 브로스는 그의 일부 또는 전부가 발효 반응기로 재순환된다. 이는 발효 브로스로부터 발효 반응기로 바이오매스를 복귀시키는 데 매력적일 수 있다.
- [0041] 락트산마그네슘의 수거는 간헐적 방식으로 불연속 단계로, 그러나 또한 연속 방식으로 수행될 수 있다. 연속적인 락트산마그네슘 수거는, 이것이 발효 브로스에 존재하는 락트산마그네슘의 양의 정확한 조절을 가능하게 하기 때문에, 바람직한 것으로 여겨진다. 이는 또한 본 발명의 바람직한 실시양태인 연속 발효 공정에 효율적으로 통합될 수 있다.
- [0042] 일반적으로, 고체 락트산마그네슘을 포함하는 발효 브로스가 반응기로부터 회수되는 단계가 수행되는 경우, 개별 단계에서 회수된 발효 브로스의 부피는 반응기의 존재하는 발효 배지의 40 부피% 이하이다. 보다 큰 백분율은 명시된 범위 내의 고체 락트산마그네슘의 농도를 유지하는 것을 어렵게 할 것이다. 개별 단계에서 회수된 발효 브로스의 부피가 반응기에 존재하는 발효 배지의 30 부피% 이하, 특히 20 부피% 이하, 보다 특히 10부피% 이하인 경우가 바람직할 수 있다.
- [0043] 본 발명에 따른 방법은 또한 발효 가능한 탄소 공급원을 포함하는 발효 배지를 발효 반응기에 제공하는 단계,

및 알칼리성 마그네슘 염의 존재 하에 락트산 생성 미생물을 이용하여 발효 배지를 발효시켜 락트산마그네슘을 포함하는 발효 브로스를 제공하는 단계를 포함한다. 상기 단계들은 일반적으로 당업자에게 공지되어 있다. 이들은 배경 목적을 위해 하기 설명될 것이다.

- [0044] 본 발명에 따른 방법에서 발효 가능한 탄소 공급원을 포함하는 발효 배지가 발효 반응기에 제공된다. 본원에서 사용되는 바와 같이 용어 "발효 가능한 탄소 공급원"은 락트산 생성 미생물로 발효될 수 있는 탄수화물을 의미한다. 발효 가능한 탄소 공급원의 예는 C5 당, C6 당, 이의 올리고머(예: 이합체 C12 당) 및/또는 이의 폴리머, 뿐만 아니라 또한 글리세롤과 같은 화합물이다. C5 당 및 C6 당은 각각 5개 및 6개의 탄소 원자를 갖는 당류를 의미하며, C12 당은 12개의 탄소 원자를 갖는 당류(예: 이당류)를 의미한다. 특정 미생물이 발효시킬 수 있는 발효 가능한 탄소 공급원의 종류는 다양할 수 있고 통상적으로 사용된 락트산 생성 미생물에 따른다. 락트산 생성 미생물에 의해 발효 가능한 통상적인 당의 예는 C5 당, 예컨대 아라비노스, 크실로스 및 리보스; C6 당, 예컨대 글루코스, 프럭토스, 갈락토스, 람노스 및 만노스; 및 C12 당, 예컨대 수크로스, 말토스 및 이소말토스를 포함할 수 있다. 당업자의 일반적인 지식에 기초하여 탄소 공급원 및 미생물의 적합한 조합을 선택하는 것은 당업자의 범위 내에 있다.
- [0045] 반응 배지 중 탄소 공급원의 농도는 탄소 공급원의 성질, 미생물의 성질 및 추가 발효 조건에 따를 것이다. 여기서 적합한 농도를 선택하는 것은 당업자의 범위 내에 있다.
- [0046] 발효 배지는 추가의 영양소를 탄소 공급원 및 물과 배합하여 제공될 수 있다. 추가의 영양소는 임의 순서로 및 고체 형태로, 용액으로서 또는 (예를 들어 수중의) 현탁액으로서 첨가될 수 있다.
- [0047] 락트산 또는 락테이트 염을 제조하기 위한 발효에서 사용하는 데 적합한 영양소는 당해 분야에 공지되어 있다. 추가의 영양소는 예를 들어, 미네랄 염(예: 미네랄 질소, 포스페이트, 황 및 미량 원소, 예컨대 아연, 마그네슘, 칼슘, 망간, 칼륨, 나트륨, 붕소, 철, 코발트, 구리, 몰리브덴, 니켈, 알루미늄 등의 공급원) 및 유기 질소의 공급원(예: 효모 자기분해물 및 가수분해산물, 식물성 단백질 가수분해산물, 동물성 단백질 가수분해산물, 및 밀 또는 옥수수 칩 처리 유래 가용성 부산물) 중 하나 이상으로부터 선택될 수 있다. 이러한 유기 질소 공급원은 일반적으로 예를 들어 유리 아미노산, 올리고펩티드, 펩티드, 비타민 및 미량의 효소 보조인자의 형태로 질소를 제공한다. 추가로 또한 이러한 유기 질소 공급원은 개별적으로 및/또는 순수 형태로 첨가될 수 있다.
- [0048] 발효 배지의 pH는, 접종 전에, 선택된 미생물의 발효에 적합한 pH로 조정될 수 있다. 일반적으로, pH는 약 2.0 내지 약 8.0, 특히 약 4.0 내지 약 7.5의 pH로 조정될 수 있다. 발효 배지의 초기 pH에 따라, pH 조정은 염기(예: 알칼리성 마그네슘 염) 또는 산(예: H2SO4)의 첨가에 의해 수행될 수 있다. 발효 배지는 알칼리성 마그네슘 염의 존재 하에 락트산 생성 미생물을 이용하여 발효되어 락트산마그네슘을 포함하는 발효 브로스를 제공한다. 발효는 일반적으로 적합한 시간 동안 적합한 온도에서 발효 배지를 미생물로 배양시켜 수행된다.
- [0049] 발효 중에, 락트산마그네슘이 고체 형태로 침전될 것이다. 락트산마그네슘의 침전이 일어나는지는 발효 배지 중 발효 가능한 탄수화물의 농도, 발효 온도, 발효 배지의 다른 구성요소의 농도, 락트산마그네슘 농도 및 첨가된 알칼리성 마그네슘 염의 희석배율에 의존할 것이다.
- [0050] 적합한 락트산 생성 미생물은 당해 분야에 공지되어 있고, 박테리아, 진균 및 효모를 포함할 수 있으며, (a) 동형락트산 락트산 생산자 또는 (b) 락트산을 생성하는 헤테로발효성 미생물인 미생물로부터 선택될 수 있다. 미생물은 락트산을 생산하거나 과생산하도록 유전자 변형될 수 있다. 이러한 미생물의 예는, 속 락토바실루스(*Lactobacillus*), 류코노스톡(*Leuconostoc*), 페디오코쿠스(*Pediococcus*), 락토코쿠스(*Lactococcus*), 스트렙토코쿠스(*Streptococcus*), 아에로코쿠스(*Aerococcus*), 카르노박테리움(*Carnobacterium*), 엔테로코쿠스(*Enterococcus*), 오에노코쿠스(*Oenococcus*), 스포로락토바실루스(*Sporolactobacillus*), 테트라제노코쿠스(*Tetragenococcus*), 바고코쿠스(*Vagococcus*), 웨이셀라(*Weissella*), 바실루스(*Bacillus*)(바실루스 코아굴란스(*Bacillus coagulans*), 바실루스 리케니포르미스(*Bacillus licheniformis*), 바실루스 스미티이(*Bacillus smithii*), 바실루스 테르모락티스(*Bacillus thermolactis*) 및 바실루스 테르모아미로보란스(*Bacillus thermoamylovorans*) 포함), 게오바실루스(*Geobacillus*)(게오바실루스 스테아로테르모필루스(*Geobacillus stearothermophilus*) 및 게오바실루스 테르모글루코시단스(*Geobacillus thermoglucosidans*) 포함), 칼디셀룰로시립토(*Caldicellulosiruptor*)(칼디셀룰로시립토 사카롤리티쿠스(*Caldicellulosiruptor saccharolyticus*) 포함), 클로스트리디움(*Clostridium*)(클로스트리디움 테르모셀룸(*Clostridium thermocellum*) 포함), 테르모아나에로박테리움(*Thermoanaerobacterium*)(테르모아나에로박테리움 사카롤리티쿰(*Thermoanaerobacterium saccharolyticum*) 포함), 테르모아나에로박터(*Thermoanaerobacter*) 및 에스케리키아(*Escherichia*)(에스케리키

아 콜리(*Escherichia coli*) 포함)의 박테리아 종 및 속 사카로마이세스(*Saccharomyces*)(사카로마이세스 세레비지아에(*Saccharomyces cerevisiae*) 포함), 클루이베로마이세스(*Kluyveromyces*)(클루이베로마이세스 락티스(*Kluyveromyces lactis*) 및 클루이베로마이세스 마르크시아누스(*Kluyveromyces marxianus*) 포함), 이사첸키아(*Issatchenkia*)(이사첸키아 오리엔탈리스(*Issatchenkia orientalis*) 포함), 피키아(*Pichia*)(피키아 스티피티스(*Pichia stipitis*) 포함), 칸디다(*Candida*)(칸디다 보이디니이(*Candida boidinii*), 칸디다 마그놀리아(*Candida magnolia*), 칸디다 메나토소르보사(*Candida methanosorbosa*), 칸디다 소노렌시스(*Candida sonorensis*) 및 칸디다 유틸리스(*Candida utilis*) 포함) 및 리조푸스(*Rhizopus*)(리조푸스 아리주스(*Rhizopus arrhizus*), 리조푸스 미크로스포레스(*Rhizopus microspores*) 및 리조푸스 오리자에(*Rhizopus oryzae*) 포함) 유래 진균 및 효모 종을 포함하며, 이에 제한되지 않는다.

- [0051] 특히 관심 있는 박테리아 속은 락토바실루스, 바실루스(바실루스 코아굴란스, 바실루스 리케니포르미스, 바실루스 스미티이, 바실루스 테르모락티스 및 바실루스 테르모아밀로보란스 포함), 게오바실루스(게오바실루스 스테아로테르모필루스 및 게오바실루스 테르모글루코시단스 포함) 및 에스케리키아(에스케리키아 콜리 포함)이다.
- [0052] 추가로 또는 대안적으로, 바람직한 박테리아 종은 약 6 내지 약 8 범위 내의 pH에서 최적 성장을 나타내는 박테리아 종이다.
- [0053] 배양 온도는 사용되는 미생물에 따라 수 있다. 예를 들어, 사용되는 최적 온도는 상이한 온도 조건 하에 발효 미생물의 활성을 분석하여 확립될 수 있다. 일반적으로, 온도는 약 20℃ 내지 약 80℃ 범위 내, 특히 약 25℃ 내지 약 70℃ 범위 내, 보다 특히 약 30℃ 내지 약 60℃ 범위 내일 수 있다.
- [0054] 발효 배지에 첨가된 알칼리성 마그네슘 염은 발효 중에 미생물에 의해 분비된 락트산을 중화시켜 락트산마그네슘 염을 생성하도록 사용된다. 공정에서 사용되는 미생물에 따라, 임계 값 미만으로의 pH의 저하는 미생물의 대사 과정을 손상시키고 발효 공정이 중단되게 할 수 있다. pH는 일반적으로 발효 중에 약 2.0 내지 약 8.0, 특히 약 4.0 내지 약 7.5로 조정된다. pH 조정은 발효 배지의 pH를 조절하는 것 및 필요시 적정량의 염기를 첨가하는 것에 의해 수행될 수 있다. 알칼리성 마그네슘 염은 예를 들어 MgO, Mg(OH)₂, MgCO₃ 및 Mg(HCO₃)₂ 중 하나 이상으로부터 선택될 수 있다. 알칼리성 마그네슘 염은 소량의 다른 양이온을 함유할 수 있다.
- [0055] 본 발명에 따른 방법에 의해 얻어진 락트산마그네슘은 원하는 대로 가공될 수 있다. 이는 당해 분야에 공지된 방식으로, 예를 들어 재결정화를 통해, 중간 정제 단계로 처리되어 정제된 락트산마그네슘을 생성할 수 있다.
- [0056] 락트산마그네슘은 예를 들어 락트산으로 전환될 수 있다. 이는 수성 배지 중에 락트산 및 마그네슘 염의 혼합물을 제공하기 위한 이온 교환법, 예를 들어 이온 교환 컬럼 또는 전기투석, 또는 강한 무기산(예: 황산, HCl 또는 HNO₃)을 이용하는 산성화를 사용하는 것을 비롯한 다양한 방법에 의해 수행될 수 있다. 상기 혼합물은 후속하여 락트산/마그네슘 염 분리 단계로 처리되어 락트산 및 분리된 마그네슘 염의 형성을 유도할 수 있다.
- [0057] 분리 단계는 당해 분야에 공지된 방법으로 수행될 수 있다. 마그네슘 염이 고체 형태인 경우, 예를 들어 황산이 산성화 단계에서 사용된 경우, 락트산/마그네슘 염 분리 단계는 고체/액체 분리 단계의 형태일 수 있고, 여기서 고체 마그네슘 염이 수거되어, 락트산 수용액의 형성을 유도한다.
- [0058] 마그네슘 염이 용해된 염으로서 혼합물에 존재하는 경우, 예를 들어 산성화 단계에서 HCl이 사용되는 염화마그네슘의 경우에, 마그네슘 염 용액으로부터 락트산을 분리하는 것은 예를 들어 염 수용액과 혼화성이 아닌 유기 추출제를 사용하여 염 용액으로부터 락트산을 추출함으로써 수행될 수 있다. 이후 락트산은 예를 들어 증발을 통해 용매를 제거함으로써, 또는 물을 이용하여 추출제로부터 락트산을 추출함으로써 추출제로부터 회수되어 락트산 수용액의 형성을 유도할 수 있다.
- [0059] 락트산 수용액은 당해 분야에 공지된 방법, 예를 들어 활성 탄소로의 처리에 의해 정제될 수 있다. 이는 물의 제거에 의해 농축될 수 있다. 락트산은 예를 들어 증류에 의해 정제되어 정제된 락트산을 생성할 수 있다. 락트산은 필요한 경우 결정화되어 고체 결정질 락트산을 형성할 수 있다. 이는 또한 물의 제거에 의해 올리고머화 단계로 처리되어 락트산 올리고머를 형성할 수 있다.
- [0060] 본 발명에 따른 방법에 의해 얻어진 락트산은 락티드로 전환될 수 있다. 락티드, 또는 락트산 자체는 폴리락트산으로 전환될 수 있다.
- [0061] 락트산마그네슘의 처리, 이의 락트산으로의 전환, 락트산의 추가 처리, 및 락티드 및 폴리락트산의 제조를 위한 다양한 방법들은 관습적이며 추가 설명이 필요하지 않다.

- [0062] 본 발명은 추가로 하기 실시예에 의해 설명되며, 이것에 또는 이것에 의해 제한되지 않는다.
- [0063] 실시예 1
- [0064] 본 발명에 따른 락트산마그네슘 발효를 하기와 같이 수행하였다. 탄소 공급원으로서 수크로스를 추가의 영양소 및 물과 함께 발효 반응기 내로 이송되어 발효 배지를 형성한다. 발효 배지를 정해진 pH 및 온도를 비롯한 발효 조건으로 이행시켰다. 배지를 락트산 생산 가능한 미생물로 접종하였다. 발효 중에, 발효 배지의 pH를 모니터링 하고, 이를 수산화마그네슘 슬러리의 첨가에 의해 선택된 값에서 유지하였다. 기질로서 수크로스를 발효 배지에 연속적으로 첨가하였다.
- [0065] 고체 락트산마그네슘 농도가 공정 전체 동안 10-40 부피% 범위 내, 그리고 작업 시간의 약 50% 동안 15-30 부피% 범위 내이게 하는 방식으로 고체 락트산마그네슘의 주기적인 수거를 수행하였다. 이는 매 4-10시간마다 반응기의 바닥부로부터의 결정 슬러리의 수거, 이로부터 고체 락트산마그네슘의 수거, 및 액체 유출물의 반응기로의 재순환에 의해 수행되었다.
- [0066] 발효 시작시로부터 시작한 50시간 동안(10회 생성물 수거)에 걸친 본 발명에 따른 방법의 이용은 1시간당 1리터당 락트산마그네슘 그램으로 표현되는 높은 평균 생산성을 유도하는 것으로 나타났다.
- [0067] 본 발명에 따른 방법에서 얻어진 락트산마그네슘을 여과에 의해 결정 슬러리로 부터 분리하였다. 생성된 필터 케이크는 26 중량% 내지 32 중량%의 수분 함량을 가졌다. 이는 락트산마그네슘의 여과 특성이 효율적인 생성물 분리가 가능하게 함을 의미한다. 고체 락트산마그네슘 농도가 너무 오랫동안 5 부피% 미만인 경우, 수분 함량이 더 높은 필터 케이크가 얻어질 것이며, 이는 생성물 분리를 더 어렵게 한다.