



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 313 754**

51 Int. Cl.:  
**C12P 7/56** (2006.01)  
**C12N 1/20** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **98952263 .6**  
96 Fecha de presentación : **13.10.1998**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1025254**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.08.2000**

54 Título: **Fermentación de ácido láctico a pH bajo.**

30 Prioridad: **14.10.1997 US 949420**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.03.2009**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.03.2009**

73 Titular/es: **CARGILL, INCORPORATED**  
**15407 McGinty Road, P.O. Box 5624**  
**Minneapolis, Minnesota 55391-2399, US**

72 Inventor/es: **Carlson, Ting, Liu y**  
**Peters, Eugene, Max, Jr.**

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

**ES 2 313 754 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

# ES 2 313 754 T3

## DESCRIPCIÓN

Fermentación de ácido láctico a pH bajo.

### 5 Antecedentes de la invención

El ácido láctico y sus sales se han utilizado durante largo tiempo en una amplia variedad de aplicaciones en las industrias química, cosmética, de alimentos y farmacéutica. Más recientemente, nuevos materiales de bioingeniería basados en lactato, tales como polímeros de lacturo biodegradable, han encendido una demanda creciente por el lactato y especialmente por la forma libre de ácido del lactato L o D. El uso de ácido láctico en la producción de varios polímeros industriales se ha descrito, por ejemplo, en las Patentes U.S.: 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; y 5,594,095.

Aunque los procesos químicos se pueden utilizar para producir ácido láctico, los costos elevados de las materias primas petroquímicas y la necesidad de resolver la mezcla de lactato racémico producido por métodos químicos convencionales, hacen los métodos de fermentación una alternativa atractiva para la elaboración del lactato enriquecido en uno de sus isómeros ópticos. Los procesos utilizados para producir polímeros de lacturo biodegradables requieren típicamente la forma de ácido libre del lactato L o D como material de partida. Desafortunadamente, como con la mayoría de las fermentaciones de ácido orgánico, la inhibición del producto final por el ácido orgánico (ácido láctico en este caso) puede ser el principal obstáculo para las fermentaciones eficientes. Las cepas bacterianas típicamente empleadas en las fermentaciones de lactato se pueden inhibir por un pH bajo además de la concentración del lactato. Para solucionar este problema, se corren procesos de fermentación industriales de lactato típicamente a un pH más alto, por ejemplo, por lo menos aproximadamente 5.0 y a menudo a o por encima de 6.0. Esto da como resultado la producción de un producto de lactato que esencialmente está todo presente en la forma de una sal. La o las etapas de proceso adicionales se requieren típicamente para remover el contra ión catiónico y aislar el ácido láctico libre deseado. Más aún, en razón a que las altas concentraciones de ciertas sales, por ejemplo, cationes de sodio, pueden tener un efecto inhibitorio sobre la fermentación, el tipo y/o cantidad de sal presente también puede influenciar la eficiencia de la fermentación.

Se ha reportado la producción de lactato racémico proveniente de almidón de maíz rebajado con enzima que utiliza *Lactobacillus amylovorus*. Cheng *et al.*, J. Ind. Microbiol. 7:27-34 (1991). Aunque se han reportado niveles de producción relativamente altos a un pH tan bajo como 4.2, esta fermentación no suministra lactato enriquecido en cualquier isómero óptico.

Se ha reportado un número de aproximaciones para mejorar la eficiencia de las fermentaciones de de lactato. Varias de estas involucran la remoción del ácido láctico libre proveniente del caldo de fermentación sobre una base continua. Por ejemplo, la electrodiálisis se ha utilizado para reducir la inhibición del producto final a través de la remoción de lactato proveniente del caldo de fermentación. Los altos costos de las membranas de diálisis acoplados con un gradiente de lactato bajo generalmente han disminuido la atracción de esta aproximación. El intercambio de ión y el uso de polivinilpiridina para remover el lactato proveniente del medio de fermentación también se ha reportado. Aún otro método que se ha descrito recientemente, involucra un procedimiento de extracción multietapa. Este proceso involucra una extracción de lactato proveniente del caldo con una amina terciaria en un intento por evitar la caída del pH del caldo a un valor que inhiba adicionalmente la producción de lactato. Los niveles de producción de lactato logrados según reportes por vía de este método son aún, sin embargo, muy bajos. La utilización de este método también puede requerir que el caldo de fermentación extraído se someta a una segunda extracción a por lo menos reducir la concentración residual del extracto de amina terciaria antes de reciclar el caldo extraído de nuevo en la reacción de fermentación.

La Patente U.S. No. 4,769,329 (Cooper *et al.*) describe un proceso para la preparación de un ácido láctico D o L ópticamente puro mediante la fermentación utilizando *Lactobacillus* a un pH entre 4 y 6. Sin embargo, Cooper *et al.*, no describe un alto rendimiento a un pH bajo.

La JP 87 44188 describe la producción de un ácido láctico ópticamente activo a un pH entre 4.5 y 7.0 y una concentración de 101 g/L.

La JP 92 271 787 describe un método para elaborar ácido láctico D al cultivar *Psuedomonas* que producen L a un pH de 8.0 en un medio que contiene, 1,2-propanodiol. Después de que se completa la fermentación, se acidifica el cultivo con ácido sulfúrico a un pH de 2.0 para obtener 21 g/L de ácido láctico D.

La EP 0 308 064 describe una bebida de tomate mejorada preparada al fermentar la bebida de tomate con *Lactobacillus*. Nada en la EP 0 308 064 discute el rendimiento o la pureza óptica del ácido láctico obtenido en tal fermentación.

La GB 2 251864 describe una cepa tolerante al ácido de *Lactobacillus* estable a baja temperatura obtenido al cultivar una población mezclada de *Lactobacillus* en un medio que comprende leche a un pH de 3.4 a 4.2. Nada en la GB 2 251 864 describe el rendimiento o la pureza óptica del ácido láctico obtenido del *Lactobacillus* estable a baja temperatura.

## ES 2 313 754 T3

La DE 27 00 644 (igual que la GB 1547063) describe la fermentación del material vegetal y/o animal utilizando bacterias de *Streptococcus faecalis* o bacterias de *Leuconostoc* tolerantes a ácido formadoras de ácido láctico en un medio que tiene un pH entre 4 y 4.7 para formar materias primas para fincas y animales doméstico y pollos. No se describe el rendimiento del ácido láctico al pH especificado.

5 Todas estas aproximaciones para producir ácido láctico en su forma de ácido libre con base en la fermentación de lacto bacillus sufren de una o más desventajas. También se han reportado las aproximaciones alternativas basadas en las fermentaciones de otros microorganismos más tolerantes al ácido. Las levaduras, tales como la *Saccharomyces cerevisiae*, es capaz de crecer a pH mucho más bajo que el *Lactobacillus*. Se han producido cepas de levadura recombinate al introducir el gen del lactato deshidrogenasa proveniente de una fuente bacteriana (*Lactobacillus*) o de mamífero (bovino) en el *Saccharomyces cerevisiae*. Las cepas de levadura recombinantes se han reportado como capaces de producir lactato en o por debajo del pK, de ácido láctico (aproximadamente 3.8). El etanol, es, sin embargo, el principal producto de fermentación generado por estas cepas de levadura recombinantes. Ambas de éstas disminuyen la eficiencia de la producción de lactato e introducen temas potenciales adicionales con relación a la separación y purificación del ácido láctico libre. También se ha reportado la producción de ácido láctico por una forma de microesfera del hongo, *Rhizopus oryzae*. Esta fermentación fungosa también produce típicamente glicerol y/o etanol como subproductos principales. El rendimiento del ácido láctico libre se optimizó en este caso mediante la remoción continua del caldo de fermentación utilizando una columna de polivinilpiridina ("PVP"). No se reportó ninguna concentración de lactato mayor de aproximadamente 25 g/L por haber sido generada un pH de baja fermentación que utiliza el método de *Rhizopus/PVP*.

### Resumen de la invención

La presente invención se relaciona con la producción de lactato por vía de fermentación. Esto preocupa particularmente la fermentación con microorganismos que producen lactato tolerantes a ácido, tales como las bacterias tolerantes a ácido, para producir el caldo de fermentación con altos niveles de ácido láctico libre. La presencia del alto nivel de ácido láctico libre puede facilitar el procesamiento bajo de la corriente requerido para aislar el lactato en su forma de ácido libre proveniente del caldo.

30 Como se define en la reivindicación 1, la invención se relaciona con un proceso para producir ácido láctico que comprende:

suministrar un medio nutriente:

35 inocular el medio nutriente con microorganismos que producen lactato tolerantes a ácido; y

Incubar los microorganismos que producen lactato tolerantes a ácido en el medio nutriente a un pH de incubación promedio de no más de 4.2 para generar una solución que incluya por lo menos 50 g/L de lactato a un pH de incubación final de 4.3 o inferior en donde el lactato tiene una pureza óptica de por lo menos 50%.

Las modalidades preferidas del proceso de la invención se establecen en las sub-reivindicaciones de proceso que se incorporan aquí en su totalidad mediante referencia.

45 En general, se ha determinado que con procesos conducidos para hacer los caldos de fermentación (u otras mezclas de ácido láctico/sal de lactato) a pH del orden de aproximadamente 4.8 o inferiores (preferiblemente 4.5 o inferiores, más preferiblemente 4.3 o inferiores, típicamente 3.5 a 4.2), o se puede desarrollar el proceso de eficiencia total, en el cual el ácido láctico generado se puede utilizar en la producción de polímero y, si se desea, la sal de lactato recuperada se puede reciclar en el sistema de fermentación como un agente amortiguador, o de manera diferente poner el control de pH.

El proceso suministrado aquí para producir el ácido láctico incluye incubar microorganismos que producen lactato tolerantes a ácido, tales como *Lactobacillus* homoláctico tolerantes a ácido, en un medio nutriente a un pH que se ajusta a una porción sustancial del producto de lactato en la forma de ácido libre. Aquí, cuando se emplea el término "tolerante a ácido" en referencia a la bacteria, se intenta referirse a las bacterias que son capaces de producir lactato a un pH suficiente para ajustar una porción sustancial del producto de lactato en la forma de ácido libre. Las bacterias tolerantes a ácido son típicamente capaces de producir por lo menos aproximadamente 25 g/L de ácido láctico libre. Tales bacterias generalmente también pueden producir por lo menos aproximadamente 50 g/L de lactato (es decir, 50 g/L de lactato total) en medio nutriente a un "pH de incubación promedio" de no más de aproximadamente 4.2.

60 Si no se lleva a cabo la fermentación en un punto donde la concentración de lactato limitante se alcance, el "pH de incubación promedio" se determina con base en el promedio de los valores de pH medidos a diez (10) o más intervalos de tiempo igual sobre el curso de la fermentación. El presente proceso de fermentación puede correr de una forma continua. Bajo tales condiciones, las condiciones de régimen estacionario (en términos del pH, la concentración del lactato y las concentraciones de nutriente) se logran y se mantienen generalmente después de que ha concluido la fase de arranque inicial. Cuando se concluye la fermentación de esta manera, el pH de incubación promedio es el pH promedio del caldo después de que la fase de arranque inicial se ha completado, es decir, el pH durante la fase de arranque se ignora para determinar el pH de incubación promedio.

## ES 2 313 754 T3

Si se lleva a cabo la fermentación a un punto donde el pH y/o la concentración de ácido láctico inhibe adicionalmente la producción adicional de lactato, el “pH de incubación promedio” se determina con base en el promedio de los valores de pH medidos en diez (10) o más intervalos de tiempo iguales durante el período de tiempo necesario para producir 90% de la concentración de lactato limitante. Como se utiliza aquí, la “concentración de lactato limitante” es la concentración de lactato bajo un conjunto dado de condiciones de incubación (medio nutriente, temperatura, grado de aireación) al cual el pH y/o la concentración de ácido láctico generada por la fermentación inhibe adicionalmente la producción de lactato. Como se utiliza aquí, el término “pH de incubación limitante” significa el pH del caldo de fermentación para un conjunto dado de condiciones de incubación en la cual el pH y/o la concentración de ácido láctico inhibe adicionalmente la producción de lactato. La inhibición de la producción de lactato se considera que ha ocurrido cuando la cantidad de lactato producido no se incrementa en más de aproximadamente el 3% luego de la incubación adicional durante un período de hasta aproximadamente doce (12) horas bajo las mismas condiciones. Esta definición presume que los nutrientes suficientes para la producción de lactato, están aún disponibles en el caldo de fermentación.

Aquí los términos “medio nutriente” y “caldo de fermentación” se utilizan intercambiamente. Estos términos se refieren a tanto (i) el medio en la forma originalmente suministrada a las bacterias tolerantes a ácido como una fuente de nutriente y (ii) el medio producido después de que alguno o todos los nutrientes originalmente suministrados se han consumido y los productos de fermentación que incluyen el lactato se han excretado hacia el medio por la bacteria.

En el presente proceso, el pH del caldo de fermentación después de la incubación de las bacterias tolerantes al ácido para producir lactato es típicamente no más de 4.2 (“pH de incubación final”). Como se denomina aquí, el “pH de incubación final” es el pH del caldo de fermentación en el punto en que el crecimiento y/o la producción de lactato por las bacterias tolerantes a ácido cesa. La terminación del crecimiento y/o la producción de lactato puede ser el resultado de un cambio en la temperatura de reacción, el agotamiento de uno o más de los nutrientes necesarios en el caldo de fermentación, un cambio deliberado en el pH, o la separación del caldo de fermentación proveniente de las células bacterianas. En aquellos casos donde se disminuye la fermentación mediante la adición de ácido o base suficiente al caldo para detener la producción de lactato, el pH de incubación final se define por ser el pH del medio nutriente justo antes a la adición. Alternativamente, el crecimiento y/o la producción de lactato se puede detener debido a la acumulación de uno o más productos de fermentación y/o un cambio en el pH del caldo que resulta de la acumulación de los productos de fermentación, es decir, la reacción de fermentación ha alcanzado un punto auto-limitante para el conjunto dado de condiciones de incubación. Como se notó anteriormente, es muy común para las fermentaciones bacterianas que producen un ácido orgánico tal como el ácido láctico someterse a la inhibición del producto final.

El término “lactato” como se utiliza en esta aplicación se refiere a 2-hidroxiopropionato en su forma de ácido libre o sal (es decir, “lactato total”). Los términos “ácido láctico” y “ácido láctico libre” se emplean intercambiamente aquí para referirse a la forma de ácido, es decir, al ácido 2-hidroxiopropiónico. La forma de sal del lactato se denomina específicamente aquí como sal de lactato, por ejemplo, como la sal de sodio del ácido láctico o el lactato de sodio.

La presente invención también suministra una bacteria homoláctica tolerante a ácido. La presente bacteria tolerante al ácido se capaz de producir por lo menos 50 g/L de lactato a una temperatura por encima de 40°C y un pH de incubación promedio de no más de 4.2. Típicamente, la bacteria tolerante a ácido es capaz de satisfacer ambas de estas medidas de la productividad de lactato.

### 45 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una descripción esquemática de un diagrama de flujo de un proceso de fermentación que incluye la remoción acoplada del ácido láctico libre.

La Figura 2 es una gráfica que muestra los patrones de ribotipo para un número de cepas bacterianas que producen lactato aisladas de agua para empapar maíz.

La Figura 3 es una gráfica que muestra el perfil de fermentación de la glucosa, la fructosa y el lactato para la incubación de la cepa #41 en un medio nutriente que contiene 10% vol. de maíz empapado en licor, 100 g/L de glucosa y 33.4 g/L de carbonato de calcio.

La Figura 4 es una gráfica que muestra la producción de lactato proveniente de la incubación de la cepa #41 en un medio nutriente que contiene 90 g/L de glucosa, 33.4 g/L de carbonato de calcio y 12% vol. de maíz empapado en licor o 36% vol. del agua para empapar ligera.

La Figura 5 es una gráfica que muestra el perfil de fermentación de la glucosa, la fructosa y el lactato para la incubación de la cepa homoláctica #41 en un medio nutriente que contiene 90 g/L de glucosa, 36.6 g/L de carbonato de calcio y cantidades variables de agua para empapar maíz.

La Figura 6 es una gráfica que muestra el porcentaje de ácido láctico no disociado (“ácido láctico libre”) como una función del pH.

## ES 2 313 754 T3

### Descripción detallada

La generación de soluciones de ácido láctico, por vía de sistemas bacteriológicos, que tienen pH del orden de 5.0 o menos, preferiblemente 4.8 o menos y típicamente 3.5 a 4.5, conducen a un porcentaje mayor de producción del material lactato, en la forma de ácido láctico. La generación de cantidades relativamente grandes del producto proveniente del proceso de fermentación en la forma de ácido láctico, en lugar de la sal de lactato, es ventajosa en razón a que ésta puede reducir la necesidad de, o la proporción de, ciertas etapas de proceso de seguimiento de acidulación y/o “división de sal”. Esto es, si una cantidad mayor del material se genera como el ácido láctico libre, una etapa de procesamiento para generar el ácido láctico proveniente del lactato, y los costos y consecuencias asociadas con éste, se reducen o se evitan. Aún si se conduce alguna acidulación, sustancialmente menos adición de ácido estaría involucrada que si fuera el caso con un sistema con pH alto. En general, se ha determinado que con los procesos conducidos para hacer los caldos de fermentación a pH del orden de aproximadamente 4.8 o menos (preferiblemente 4.5 o menos, más preferiblemente 4.3 o menos, típicamente 3.5 a 4.2), se puede desarrollar un proceso eficiente total, en el cual el ácido láctico generado se puede utilizar en la producción de polímero, y la sal de lactato recuperada se puede reciclar en el sistema de fermentación como un agente amortiguador, o poner de manera diferente el control de pH.

El presente proceso permite la producción eficiente de lactato y, en particular, la producción eficiente de altas concentraciones de ácido láctico libre por vía de incubación de una bacteria homoláctica tolerante a ácido en un medio nutriente adecuado. La bacteria homoláctica tolerante a ácido se puede aislar del agua para empapar maíz de una instalación de molinada de maíz comercial. Aunque diferentes bacterias de este tipo pueden producir lactato racémico, o lactato predominantemente en la forma isomérica D o L, el presente proceso emplea preferiblemente una bacteria homoláctica que produce predominantemente lactato L o D, y más preferiblemente produce lactato L en forma ópticamente pura.

El presente proceso permite la producción eficiente de altas concentraciones de la forma de ácido libre de un isómero óptico de ácido láctico. Esta eficiencia se puede expresar en una variedad de maneras. La concentración del ácido láctico libre en el caldo de fermentación sirve como una medida de la productividad total del proceso. El presente proceso genera típicamente una solución que incluye por lo menos aproximadamente 25 g/L, preferiblemente por lo menos aproximadamente 30 g/L, y más preferiblemente por lo menos aproximadamente 40 g/L de ácido láctico libre. Más preferiblemente, el proceso produce estos niveles del ácido láctico L libre o ácido láctico D libre. La pureza óptica del lactato (y el ácido láctico libre) producido es preferiblemente de por lo menos aproximadamente 50%, más preferiblemente por lo menos aproximadamente 80% y, más preferiblemente, un isómero óptico de lactato se produce esencialmente en forma pura.

Como se notó anteriormente, típicamente, el lactato producido mediante el presente proceso está predominantemente en forma de lactato L. Por ejemplo, una modalidad del proceso incluye incubar una bacteria homoláctica tolerante a ácido en un medio nutriente para producir lactato que incluya por lo menos aproximadamente 75% en peso de lactato L (es decir, el lactato L que tiene una pureza óptica de por lo menos aproximadamente 50%). Preferiblemente, la pureza óptica del lactato producido por medio del presente proceso es de por lo menos aproximadamente 80%, y más preferiblemente por lo menos aproximadamente 90% (por ejemplo, incluye por lo menos aproximadamente 95% en peso de lactato L). Más preferiblemente, el presente proceso produce lactato L o D en forma esencialmente ópticamente pura (es decir, el lactato producido contiene 99% en peso o más de un isómero óptico único).

Si un caldo de fermentación tiene un valor pH entre 3.0 y 4.5, habrá una cantidad significativa de ácido láctico en la forma no disociada (ver Fig. 6). De hecho a un pH de 3.0 la proporción molar del ácido láctico libre (no disociado) a ión de lactato a 25°C es de aproximadamente 7.0; y, a un pH de aproximadamente 4.5 la proporción a 25°C, es de aproximadamente 0.23. La cantidad total de ácido láctico libre presente en una solución es una función tanto del pH de la solución como de la concentración total del lactato en la mezcla. Así, especificar estos dos parámetros para una solución dada, tal como un caldo de fermentación, especifica efectivamente la concentración de ácido láctico libre. El presente proceso es capaz de generar una solución que incluya por lo menos 50 g/L, preferiblemente por lo menos 80 g/L, y más preferiblemente por lo menos 100 g/L a un pH relativamente bajo. Entre más bajo sea el pH de la solución, mayor será el porcentaje de lactato que esté presente en su forma de ácido libre. Por ejemplo, donde el pH medio es igual al pK, del ácido láctico (aproximadamente 3.8), 50% del lactato está presente en la forma de ácido libre. A un pH de 4.2, aproximadamente 31% de lactato como ácido libre y a un pH de 4.0 y 3.9, aproximadamente 41% y 47% respectivamente del lactato está presente en la forma de ácido libre. La fracción del ácido láctico libre es aún inferior a un pH mayor, 18% a pH de 4.5 y 6.6% a pH de 5.0.

El pH del caldo durante la etapa de incubación se puede expresar en varias diferentes maneras, por ejemplo, en términos del pH de incubación promedio o el pH de incubación final. El presente proceso de fermentación es típicamente capaz de producir altos niveles de lactato a un pH de incubación promedio de no más de aproximadamente 4.3, preferiblemente no más de aproximadamente 4.2, y más preferiblemente no más de aproximadamente 4.0. Alternativamente, el pH del caldo durante la incubación se puede expresar en términos del pH de incubación final. El presente proceso típicamente permite la producción de altas concentraciones de lactato a un pH de incubación final de no más de 4.2, preferiblemente no más de 4.0, y más preferiblemente no más de 3.9. Particularmente las modalidades efectivas del presente proceso de fermentación son capaces de producir por lo menos 80 g/L de lactato a un pH de incubación promedio de no más de 4.0 y/o un pH de incubación final de no más de 3.9.

## ES 2 313 754 T3

El presente proceso de fermentación se puede correr en una forma continua donde una fracción del caldo de fermentación se remueve en la medida en que sucede la fermentación. Esto se puede hacer continuamente o a intervalos periódicos. El medio nutriente suficiente se agrega típicamente al reactor para mantener un volumen de líquido constante. Bajo tales condiciones de fermentación, las condiciones de régimen continuo (en términos de pH, concentración de lactato y concentraciones de nutriente) se logran y se mantienen generalmente después de que la fase de arranque inicial ha concluido. Cuando concluye la fermentación de esta manera, el pH de incubación promedio (el pH durante la fase de arranque se ignora) y el pH de incubación final para el caldo son esencialmente los mismos. Bajo tales condiciones, la fermentación se lleva a cabo típicamente a un pH de no más de 4.2, preferiblemente no más de 4.0, y más preferiblemente no más de 3.9.

Aunque el presente proceso de incubación se puede llevar a cabo a temperaturas relativamente bajas, por ejemplo, aproximadamente 30°C a aproximadamente 38°C, la bacteria homoláctica tolerante a ácido se incuba típicamente en un medio nutriente adecuado a una temperatura de por lo menos aproximadamente 43°C, y más preferiblemente a aproximadamente 45°C a aproximadamente 52°C. Más preferiblemente, la fermentación se lleva a cabo a aproximadamente 47°C a aproximadamente 50°C. Existe un número de ventajas de operar la fermentación a estas temperaturas. Las posibilidades de complicaciones debido al crecimiento de otros organismos competidores se disminuyen en este rango de temperatura. Además, a temperaturas mayores, la reacción generalmente procede a una tasa más rápida que permite la utilización eficiente del equipo de proceso. Si la fermentación se lleva a cabo una temperatura demasiado alta, típicamente de aproximadamente 54°C o mayor, el crecimiento y/o la producción de lactato por las bacterias homolácticas puede ser insignificante. Puede ser posible, sin embargo, utilizar técnicas de selección estándar para identificar las cepas bacterianas homolácticas mutantes que son capaces de crecer y la producción de lactato a temperaturas de 55°C y superiores.

Como se describe aquí “medio nutriente” se refiere a una composición basada en agua que incluye minerales y sus sales necesarias para crecer la bacteria de la presente invención. El medio nutriente típicamente contiene cantidades efectivas de una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, una fuente de fosfato, una fuente de sulfato, calcio y elementos en trazas. El término “elementos en trazas” se refiere a elementos esenciales para el crecimiento en concentraciones en trazas, es decir, fracciones diminutas de 1 por ciento (1000 ppm o menos).

La bacteria de la presente invención puede utilizar típicamente un número de fuentes de carbono y energía para el crecimiento y/o producción de lactato, tal como glucosa, fructosa, galactosa, melibiosa, sacarosa, farinosa, y/o estaquiosa. Algunas de las bacterias pueden ser capaces de utilizar todo o la mayoría de estos azúcares como una fuente de carbono y energía mientras que otras cepas son más fastidiosas y solo pueden ser capaces de crecer sobre uno o dos azúcares de la lista. En otros casos, un almidón (tal almidón de maíz) o un hidrolizado de éste se puede utilizar como fuente de carbohidrato primario.

Como se utiliza aquí, “agua para empapar maíz” se refiere a agua obtenida de tanques de empapamiento de maíz así como también otras soluciones derivadas de ésta que tienen sustancialmente el mismo espectro de nutrientes. Por ejemplo, el licor que empapa el maíz (también algunas veces denominado como “agua para empapar pesada”) es una forma concentrada de agua para empapar maíz, obtenida mediante la remoción de agua y otros componentes volátiles, típicamente bajo vacío. El licor para empapar maíz típicamente tiene un contenido de sólidos secos de aproximadamente 35% en peso a aproximadamente 50% en peso. El licor para empapar maíz utilizado en los experimentos descritos en los Ejemplos presentes tuvo un contenido de sólidos secos del 36% en peso y se denomina aquí como “CSL”. Las aguas para empapar maíz, obtenidas directamente de los tanques para empapar maíz y/o las líneas asociadas solo antes de la concentración para producir licor que empapa maíz generalmente tiene contenidos de sólidos secos en el rango de aproximadamente 10% en peso a aproximadamente 15% en peso y se denomina aquí como “agua para empapar maíz” (“LSW”). El agua para empapar ligera tiene típicamente un contenido de SO<sub>2</sub> de no más de aproximadamente 500 ppm. El agua para empapar utilizada para suplementar el medio nutriente utilizado en el presente proceso tiene preferiblemente un contenido de SO<sub>2</sub> de no más de aproximadamente 300 ppm y, más preferiblemente, no más de aproximadamente 200 ppm. El agua para empapar ligera utilizada en los experimentos descritos en los Ejemplos presentes tienen un contenido de sólidos secos del 12% en peso.

En situaciones donde una o más cepas homolácticas aisladas provenientes del agua que empapa maíz se deben utilizar para producir lactato, el medio nutriente típicamente incluye agua para empapar maíz que corresponde a por lo menos aproximadamente 15 g/L de sólidos secos del agua de empapado. Preferiblemente, el medio nutriente incluye agua para empapar maíz que corresponde a por lo menos aproximadamente 25 g/L y, más preferiblemente, por lo menos aproximadamente 30 g/L de sólidos secos de agua de empapamiento.

Un ejemplo de un medio nutriente adecuado para utilizar el presente proceso de fermentación es el medio MRS (tal como el medio MRS comercialmente disponible de Becton Dickinson & Co.) o similares. El medio MRS está generalmente suplementado con agua para empapar maíz para suministrar una fuente de nitrógeno y una fuente de nutrientes general así como también con carbohidratos adicionales (tal como glucosa o fructosa) como una fuente de carbono y energía. Los medios típicos adecuados para uso en el presente proceso también incluyen sal(es) de magnesio, sal(es) de manganeso, sal(es) de fosfato, sal(es) de potasio, y/o sal(es) de citrato. Esto puede, sin embargo, no ser necesario para agregar cantidades específicas de tales sales al medio. A menudo, el medio nutriente también incluye un tensoactivo no iónico, tal como un monoéster de ácido graso de un derivado de polioxietileno de sorbitan (por ejemplo, Tween<sup>®</sup> 80 el cual es monooleato de sorbitan de polioxietileno (20)).

## ES 2 313 754 T3

El medio se puede preparar al utilizar sales separadas como fuentes de cada uno de los varios componentes inorgánicos. De manera alternativa, una sal única que actúa como una fuente de más de un componente se puede utilizar para preparar el medio nutriente. Por ejemplo, el fosfato de hidrógeno de potasio ( $K_2HPO_4$ ) se puede agregar como una fuente de tanto cationes de potasio como aniones de fosfato. Se reconocerá que después de que se han disuelto varios componentes en agua durante la preparación del medio nutriente, ocurrirá un intercambio de cationes y aniones entre las varias sales disueltas presentes. Por ejemplo, si se agrega sulfato de magnesio y citrato de amonio al agua durante la preparación del medio, la solución resultante también incluirá algo de sulfato de amonio y especies de citrato de magnesio además de las especies de sulfato de magnesio y de citrato de amonio. Un tipo de medio de nutriente que es particularmente adecuado para uso en el presente proceso de fermentación incluye agua para empapar maíz suplementada con glucosa y/o fructosa como una fuente de carbono y energía adicionales.

Un ejemplo de un medio adecuado para uso en la presente invención incluye:

agua para empapar maíz que corresponde a aproximadamente 30 a aproximadamente 45 g/L de sólidos secos del agua para empapar;

aproximadamente 80 a aproximadamente 120 g/L de glucosa, fructosa o una mezcla de éstos;

aproximadamente 0 a aproximadamente 10 g/L de extracto de levadura;

aproximadamente 0 a aproximadamente 1 g/L de un tensoactivo no iónico tal como Tween<sup>R</sup> 80;

aproximadamente 0 a aproximadamente 2 g/L de fosfato de hidrógeno de potasio ( $K_2HPO_4$ );

aproximadamente 0 a aproximadamente 0.2 g/L de sulfato de magnesio ( $MgSO_4$ );

aproximadamente 0 a aproximadamente 0.05 g/L de sulfato de manganeso ( $MnSO_4$ );

aproximadamente 0 a aproximadamente 2 g/L de citrato de amonio; y

opcionalmente, aproximadamente 10 a aproximadamente 50 g/L de carbonato de calcio ( $CaCO_3$ ).

Por las razones anteriormente discutidas, las cantidades se refieren a las cantidades de los varios materiales agregados para formar el medio y no a las concentraciones presentes de estas especies en el medio nutriente. Para elaborar tal medio nutriente, todos los componentes excepto el tensoactivo no iónico y el carbonato de calcio se disuelven generalmente en una cantidad apropiada de agua y autoclave esterilizado. El tensoactivo no iónico se agrega típicamente al medio de autoclave aunque éste esté aún a una temperatura cerca de aproximadamente 100°C. A la solución resultante se le permite típicamente enfriarse a aproximadamente 60°C o menos antes de que se agregue el carbonato de calcio.

Se ha encontrado que los medios de nutrientes adecuados para uso en el presente proceso incluye preferiblemente por lo menos aproximadamente 50 g/L de carbohidrato. Más preferiblemente, el medio nutriente incluye por lo menos aproximadamente 70 g/L y, más preferiblemente, por lo menos aproximadamente 90 g/L de carbohidrato. El carbohidrato típicamente se hace de glucosa, fructosa, galactosa, melibiosa, sacarosa, rafinosa, estaquiosa, o una mezcla de éstos. La glucosa, fructosa, y sacarosa son particularmente adecuadas para uso como una fuente de carbono y energía en el medio nutriente. Generalmente ésta no es útil para incorporar más de aproximadamente 150 g/L de carbohidrato en el medio.

Se ha encontrado que puede ser ventajoso incluir una base tal como carbonato de calcio ( $CaCO_3$ ), hidróxido de sodio (NaOH), hidróxido de amonio ( $NH_4OH$ ) y/o bicarbonato de sodio ( $NaHCO_3$ ). Típicamente por lo menos aproximadamente 30 g/L de carbonato de calcio (o una cantidad equivalente de otra base) se agrega al medio nutriente. En algunas modalidades del proceso, por ejemplo, las modalidades que producen niveles más altos de lactato, se puede preferir incluir hasta aproximadamente 40 g/L de carbonato de calcio en el medio nutriente. Mientras se pueden emplear mayores niveles de base, debido a las limitaciones en la solubilidad de las sales de carbonato de calcio y el deseo de mantener un pH de caldo relativamente bajo, generalmente no es útil incorporar más de aproximadamente 100 g/L de carbonato de calcio en el medio. Muy a menudo, la cantidad completa del carbonato de calcio presente no se disolverá inicialmente en el medio nutriente. En la medida en que tiene lugar la fermentación, algo del carbonato de calcio puede reaccionar con el ácido láctico que se forme para generar lactato de calcio. En la medida en que esto ocurre, se pueden arrastrar a la solución porciones adicionales del carbonato de calcio no disuelto. El efecto total es neutralizar una porción del ácido láctico formante y evitar que el pH del caldo caiga por debajo del nivel deseado (por ejemplo, por debajo de aproximadamente 3.8-3.9).

Puede no ser necesario agregar una base tal como carbonato de calcio para lograr este efecto. Una solución que contiene una sal de lactato (por ejemplo, lactato de calcio, sodio o amonio) se puede agregar para ayudar en el amortiguamiento del pH del caldo de fermentación. Un ejemplo de un proceso en el cual esto podría ocurrir involucraría la separación de una fracción del caldo de fermentación proveniente de la bacteria incubante, y reciclar la porción de regreso a la fermentación después de la remoción de algo o todo el ácido láctico libre en la fracción. Alternativamente, el lactato de calcio se podría aislar del caldo de fermentación (por ejemplo, en forma de sólido), y mezclarse junto con el medio nutriente que se agrega a la fermentación. En general, la adición de sal de lactato como una sal amortiguante

## ES 2 313 754 T3

puede ser ventajoso en razón a que ésta minimiza la cantidad de base neutralizante agregada al caldo de fermentación minimizando de esta manera la cantidad de lactato producido que se convierte a forma de sal.

El medio nutriente incluye por lo menos aproximadamente 70 g/L de glucosa y/o fructosa y por lo menos aproximadamente 20 g/L de carbonato de calcio son particularmente adecuados para uso en el presente proceso. Dependiendo de la cepa bacteriana empleada en el proceso, la incorporación del agua para empapar maíz (por ejemplo, en una cantidad equivalente a por lo menos aproximadamente 25 g/L de sólidos secos del agua para empapar maíz) en este medio nutriente también se pueden preferir. Es particularmente útil agregar agua para empapar maíz que contiene solamente algo de la forma quiral del lactato que se va a generar por el proceso de fermentación.

La cepa de la bacteria homoláctica y las condiciones de fermentación se escogen típicamente de tal forma que el ácido láctico libre se produce a una tasa total de por lo menos aproximadamente 0.5 g/L/hr, preferiblemente por lo menos aproximadamente 1.0 g/L/hr, más preferiblemente por lo menos aproximadamente 2.0 g/L/hr, y más preferiblemente por lo menos aproximadamente 4.0 g/L/hr. Como se utiliza aquí, la tasa total de producción del lactato o el ácido láctico libre (o lactato) se calcula al dividir la cantidad total del ácido láctico libre (lactato) producido por el tiempo de incubación. Para las fermentaciones donde se produce una concentración de lactato limitante, la tasa de producción total del ácido láctico libre (lactato) se calcula sobre el tiempo requerido para producir el 90% de la concentración limitante de ácido láctico libre (lactato).

La productividad del presente proceso también se puede expresar en términos de la tasa de producción total para el lactato. El presente proceso de fermentación generalmente se lleva a cabo bajo condiciones que producen lactato a una tasa total de por lo menos aproximadamente 1.0 g/L/hr, preferiblemente por lo menos aproximadamente 2.0 g/L/hr y, más preferiblemente, por lo menos aproximadamente 3.0 g/L/hr. Como se indica aquí, el lactato se produce preferiblemente a estas tasas en un caldo a un pH de incubación promedio de no más de aproximadamente 4.1, y más preferiblemente, no más de aproximadamente 4.0.

Ejemplos adecuados de bacterias homolácticas para uso en el presente método de fermentación se pueden aislar fácilmente de muestras de agua para empapar maíz, tal como se encuentran en instalaciones de molienda de maíz comercial. Además, otra cierta bacteria homoláctica aislada de diferentes fuentes también puede tener las capacidades necesarias para permitir una producción de pH bajo eficiente de altos niveles de ácido láctico libre.

En razón a que las bacterias homolácticas encontradas en el agua para empapar maíz requieren típicamente un medio nutriente que incluye agua para empapar maíz para crecimiento, la etapa inicial en un proceso para identificar el aislamiento de tal bacteria típicamente involucra poner en placa muestras en un medio que contiene agua para empapamiento, tal como 10% en vol. de CSL-MRS agar, y luego incubar el medio inoculado anaeróticamente a aproximadamente 45-50°C. Los aislados bacterianos se pueden sondear fácilmente para la producción heteroláctica al pasar el aislado en un medio bifásico que solo contiene agua de empapamiento en la fase inferior. Las cepas de crecimiento se monitorean entonces para la generación de gas en la parte inferior de los tubos bifásicos. Las cepas aisladas se pueden almacenar convenientemente a baja temperatura (por ejemplo, 4°C o menos) o mantenerse como un "bench stock" en agua de empapamiento/jugo de tomate/agar MRS del medio de crecimiento. Cuando se desea, una o más cepas tolerantes a ácido aisladas de esta forma del agua para empapar maíz se puede utilizar como inoculante en una fermentación de ácido láctico.

Utilizando este tipo de metodología, las muestras de agua de empapamiento obtenidas de cinco diferentes instalaciones de molienda de maíz en los Estados Unidos así como también tres instalaciones de molienda de maíz localizadas en Turquía, Inglaterra y en Holanda se examinaron para microorganismos que producen lactato. Los microorganismos aislados se caracterizaron inicialmente como heterolácticos (es decir, capaces de producir otros productos de fermentación además del lactato) o productores homolácticos. Las cepas homolácticas se caracterizaron además, entre otros, con base en la producción de lactato total, la actividad óptica del lactato producido y, en muchos casos, el pH de incubación final en ausencia de la base ( $\text{CaCO}_3$ ) agregada al medio de fermentación. Un total de 155 cepas bacterianas se aislaron. De las 109 cepas que se caracterizaron, 98 cepas (90%) produjeron lactato como el único producto de fermentación (cepas "homolácticas"). Como se emplea aquí, el término "homoláctico" se refiere a una cepa de bacteria que produce sustancialmente solo ácido láctico como producto de fermentación. Las 11 cepas restantes (11%) produjeron otros productos de fermentación además del lactato (cepas "heterolácticas"). De las 98 cepas homolácticas, 22 fueron productoras de lactato L, 18 fueron productoras de lactato D, y 58 producían lactato racémico.

Las presentes bacterias homolácticas son generalmente capaces de producir por lo menos aproximadamente 25 g/L de ácido láctico libre. Más preferiblemente, las bacterias son bacterias homolácticas capaces de producir por lo menos 30 g/L de ácido láctico L libre. En otra modalidad de la invención, la bacteria homoláctica es capaz de generar una solución que contiene por lo menos aproximadamente 40 g/L, preferiblemente por lo menos aproximadamente 75 g/L de lactato, y preferiblemente por lo menos aproximadamente 90 g/L de lactato a un pH de incubación promedio de no más de aproximadamente 4.3. Como se discutió en cualquier otra parte aquí, las cepas particularmente efectivas de las presentes bacterias homolácticas son capaces de producir estos niveles de lactato L (o lactato D) a un pH de incubación promedio de no más de 4.0 y/o un pH de incubación final de no más de 3.9.

La presente bacteria homoláctica tolerante a ácido es típicamente capaz de crecimiento y producción de ácido láctico a temperaturas entre aproximadamente 35°C y aproximadamente 53°C. La temperatura óptima para el crecimiento generalmente varía desde aproximadamente 43°C a aproximadamente 52°C y, preferiblemente, aproximadamente 47°C



## ES 2 313 754 T3

a aproximadamente 50°C, aunque se ha demostrado que la bacteria homoláctica puede crecer a temperaturas en o cercanas a la temperatura ambiente. La producción de lactato despreciable por medio de bacterias ocurre típicamente cuando la temperatura está por encima de aproximadamente 53°C o por debajo de aproximadamente 30°C. El proceso de fermentación se conduce preferiblemente a aproximadamente 47°C a aproximadamente 52°C, en razón a que las levaduras y los lactobacilos heterolácticos son menos termo tolerantes y generalmente no crecerán bien, si es que crecen, a estas temperaturas. Así, además del mejoramiento de la producción de lactato, la fermentación de las bacterias homolácticas tolerantes a ácido a temperaturas altas puede disminuir la posibilidad de los problemas asociados con la contaminación por otros organismos.

La presente bacteria homoláctica es típicamente capaz de crecimiento y producción de lactato por lo menos dentro de un rango de pH de aproximadamente 3.7 a aproximadamente 6.5 y preferiblemente por lo menos a través de un rango de pH desde aproximadamente 3.8 a aproximadamente 5.0. Aunque las bacterias pueden ser capaces de producir lactato a un pH cercano al neutro (por ejemplo, 6.0-6.5), las bacterias empleadas en el proceso presente preferiblemente son capaces de producción de lactato significativa (por ejemplo, por lo menos 50 g/L) a un pH de 4.2 o menos.

Una variedad de configuraciones de reactor que incluyen reactores de lecho empacado, reactores de tanque de agitación continua, reactores de contacto biológico rotatorio, reactores de tanda de secuenciamiento y reactores de lecho fluidizado se pueden emplear en el presente proceso. La reacción completa se puede desarrollar en un recipiente único que tiene los medios apropiados para controlar la temperatura del caldo de fermentación o, alternativamente la fermentación se puede llevar a cabo en el primer recipiente, el caldo se puede mantener a la temperatura deseada al pasar a través de un intercambiador de calor, por ejemplo, un intercambiador de calor de placa y reciclarse a la reacción de fermentación. La última disposición puede suministrar un enfriamiento más rápido de la mezcla de reacción y puede en algunos casos llevarse a cabo al mismo tiempo que se pasa el caldo a través de un módulo de separación de membrana para remover la porción del caldo (por ejemplo, donde el intercambiador de calor y el módulo de membrana están conectados en serie).

Una configuración comúnmente utilizada incluye un birreactor de reciclamiento de membrana. Los reactores de este tipo típicamente incluyen dos módulos, un recipiente de fermentación 10 y un módulo de membrana 15 (ver por ejemplo, Figura 1). Estos dos módulos se pueden conectar a un tubo o ser parte de un aparato único.

En una modalidad de la invención, las bacterias homolácticas tolerantes a ácido se pueden incubar en una primera porción del medio nutriente en el recipiente de fermentación para generar una primera solución del producto que incluye por lo menos aproximadamente 25 g/L de ácido láctico L libre. El caldo de fermentación resultante se puede separar para suministrar una primera fracción que incluye ácido láctico libre y está sustancialmente libre de células bacterianas. Esto se puede llevar a cabo al bombear una porción de la fermentación a través de un separador de celda (por ejemplo, un separador de celda de fibra hueca). La fracción que contiene la celda se recicla típicamente de nuevo al recipiente de fermentación (ver por ejemplo, Figura 1), aunque la fracción que contiene el ácido láctico se divide para procesamiento adicional. El medio nutriente adicional se agrega típicamente para mantener el volumen de líquido en el recipiente de fermentación a un nivel constante. Cuando se conduce la fermentación de esta manera, las condiciones de régimen estacionario (en términos de pH, concentración de lactato y concentraciones de nutriente) se logran generalmente y se mantienen después de que ha concluido la fase de arranque inicial. Cuando se corre en tal modo, la presente fermentación se conduce de tal manera que el pH del caldo se mantiene a 4.2 o por menos y, preferiblemente, en el rango de entre 3.7 y 4.0.

La fracción que contiene ácido láctico que se divide se puede procesar utilizando un número de métodos conocidos para separar el ácido láctico proveniente de los otros componentes de la solución. Por ejemplo, el ácido láctico se puede extraer de la solución utilizando un extracto que contiene amina terciaria. Un ejemplo de un extracto adecuado es una solución de Alamina 336 en octil alcohol. Otros métodos que se pueden utilizar para aislar el ácido láctico incluyen poner en contacto la solución con un adsorbente sólido, tal como una resina de intercambio de ión (por ejemplo, una columna de polivinilpiridina), destilando la fracción que contiene ácido láctico, o la remoción por vía de separación de membrana. Cualquiera de estos tipos de métodos de separación se puede utilizar para procesar la fracción que contiene ácido láctico para generar la fracción a la que se ha sacado el ácido láctico y una fracción aislada de lactato. La fracción a la que se ha sacado el ácido láctico puede contener algo de lactato en la forma de una sal de lactato, tal como lactato de calcio. La fracción aislada de lactato se puede procesar además utilizando cualquiera de una variedad de métodos conocidos para producir una forma pura de ácido láctico libre.

La fracción que contiene ácido láctico también se puede procesar para separar la sal de lactato (por ejemplo, lactato de calcio) en forma de sólido o solución, dejando una solución enriquecida en ácido láctico libre. La sal de lactato se puede separar utilizando una técnica adecuada tal como extracción, cristalización, separación de membrana y adsorción sobre un material sólido (por ejemplo, resina de intercambio de anión). La sal de lactato se puede regresar al recipiente de fermentación donde ésta puede servir para amortiguar el pH de la solución y evitar que el pH del caldo caiga por debajo del nivel deseado. Por ejemplo, al reciclar una cantidad suficiente de lactato de calcio como un agente amortiguante, el pH del caldo de fermentación se puede mantener a un valor cercano al pKa, del ácido láctico.

Con base en la teoría, la sal de lactato amortiguará la producción de una cantidad equivalente de una nueva producción de ácido láctico a un pH de 3.85. A un pH de 4.0, cada equivalente de sal de lactato amortiguará la producción de una cantidad de 0.7 equivalente de la nueva producción de ácido láctico.

## ES 2 313 754 T3

Una variedad de métodos están disponibles para procesar las soluciones de lactato/ácido láctico que involucran la generación de grandes cantidades de ácido láctico; por ejemplo, en solución a pH no mayores de aproximadamente 4.8 (preferiblemente no mayor de aproximadamente 4.2 o 4.3) proveniente del caldo de fermentación; y, con un aislamiento concomitante (y si se desea reciclar) de sal de lactato (típicamente lactato de calcio, lactato de potasio, lactato de sodio y/o lactato de amonio). Tales procesos se describen, por ejemplo, en la Patente U.S. comúnmente cedida (a Cargill, Inc. of Minnetonka, Minnesota), co-presentada, 6,229,046 B1 titulada LACTIC ACID PROCESSING; METHODS; ARRANGEMENTS; AND, PRODUCTS, que identifica a John N. Starr, Aharon M. Eyal, Riki Canari, Betty Hazan y Rod Fisher como inventores (en lo sucesivo denominados como la solicitud Starr *et al.*). La solicitud Starr *et al.*, se presentó la misma fecha de la presente solicitud (Oct. 14, 1997). Los procesos totales ventajosos dependerán, en parte, de la selección, entre las aproximaciones, de una que más rápidamente facilite un esquema de procesamiento efectivo en costo y eficiente total en una implementación a gran escala.

El principio se relaciona con seleccionar los procesos totales relacionados con el diseño del sistema para acomodar los dos objetivos de:

1. Aislar los productos de ácido láctico para el procesamiento de seguimiento, por ejemplo para generar polímero; y
2. Aislar la sal de lactato, preferiblemente en la forma deseable para reciclar el caldo de fermentación.

Tres aproximaciones generales son de importancia.

1. La separación de ácido láctico proveniente de la solución que deja la sal de lactato detrás; y, si se desea, la dirección de la solución residual que tiene la sal de lactato allí, después de la separación, en un fermentador;
2. El aislamiento de la sal de lactato proveniente de la solución; la dirección de la sal de lactato, si se desea, en un fermentador; y, un aislamiento de seguimiento del producto de ácido láctico proveniente de la solución residual después de la separación de la sal de lactato; y
3. La separación simultánea del ácido láctico en una corriente de sal de lactato en otra, que deja la mezcla residual.

Las técnicas descritas en Starr *et al.*, para lograr uno o ambos de estos objetivos se puede practicar en una variedad de soluciones de material de lactato (es decir, soluciones de ácido láctico y de sal de lactato disuelta). Estas soluciones pueden comprender caldo de fermentación o caldo que se ha removido del fermentador y se ha modificado de alguna manera, por ejemplo, mediante la filtración o ajuste del pH. De hecho las técnicas se pueden aplicar a las soluciones que se hacen de otras maneras también.

Las técnicas y propuestas descritas aquí, sin embargo, se desarrollaron particularmente con un enfoque sobre el procesamiento eficiente de las soluciones de caldo de fermentación, especialmente las relativamente ácidas, en las cuales la modificación del pH mediante la adición de ácido no se requiere y preferiblemente no ha ocurrido. Las composiciones típicas en las cuales se pueden aplicar estas técnicas, con respecto al pH, serían por lo menos 0.86 y menos de 6.0. Esto es, las composiciones típicas en las cuales las técnicas se practicarán, tendrán un pH dentro de este rango. Para tales composiciones la proporción molar del ácido láctico libre al ácido disociado o la sal de lactato disuelta a 25°C, está dentro de un rango de aproximadamente 1,000:1 a 0,007:1. El procesamiento más preferido involucrará soluciones con un pH del orden de aproximadamente 1.98-5.00 (proporción HLA:LA dentro del rango de aproximadamente 75:1 a 0.070:1); y, el procesamiento más preferido involucrará soluciones que tienen un pH en el rango de aproximadamente 3.0-4.5 (proporción HLA:LA en el rango de aproximadamente 7.0:1 a 0.23:1).

Como se indicó anteriormente, las soluciones dentro del rango de pH más preferido descrito anteriormente se obtienen fácilmente por vía del proceso de fermentación presente con concentraciones sustanciales de material de lactato allí. Alternativamente, se pueden utilizar otros caldos de fermentación, por ejemplo, con un ajuste de pH mediante la adición de ácido típicamente al rango dado de pH más preferido.

Aquí, habrá algunas veces referencia a "separación preferencial" de: ácido láctico de una composición que contiene ácido láctico y sal de lactato; o, sal de lactato proveniente de la composición que contiene ácido láctico y sal de lactato. El término "separación preferencial" y las variantes de ésta, en este contexto, significa referencia a la técnica de separación a la cual preferencialmente se remueve uno de los dos componentes (ácido láctico o sal de lactato) con respecto al otro. En un procesamiento típico preferido de acuerdo con la presente invención una mezcla de ácido láctico y sal de lactato se divide en dos "corrientes de producto". En una corriente de producto, (es decir, la corriente rica en ácido láctico libre), preferiblemente la proporción molar del ácido láctico libre a la sal de lactato obtenida es de por lo menos 2/1 y preferiblemente por lo menos 3/1. Con ciertas de las técnicas descritas aquí, las proporciones de por lo menos 5/1 y de hecho en proporciones de 10/1 o más son fácilmente obtenibles.

La otra corriente de producto es la corriente rica en sal de lactato. En esta corriente, preferiblemente la proporción molar del ácido láctico libre a sal de lactato es no mayor de 0.5. Con el procesamiento preferido típico como se describe aquí en las proporciones de no más de 0.3, preferiblemente no más de 0.2 y más preferiblemente 0.1 o menos se obtienen fácilmente.

## ES 2 313 754 T3

Aquí el término “corriente” cuando se utiliza en el contexto indicado por los dos párrafos previos, se refiere a una fase aislada o segmento de producto, sin relación o si esa fase o segmento de producto es una solución, sólido o una mezcla de materiales. Así, una “corriente rica en ácido láctico” es simplemente una fase o mezcla rica en ácido láctico (*versus* la sal de lactato) mediante la comparación con la mezcla original procesada; y, una “una corriente rica en sal de lactato” es una corriente rica en sal de lactato (*versus* ácido láctico) por comparación con la mezcla original procesada.

Cuando la corriente de producto enriquecida en el ácido láctico libre se obtiene como resultado de separar el ácido láctico libre de la mezcla, por ejemplo de un caldo de fermentación, el resto de la mezcla acuosa después de la remoción del ácido láctico libre se denominará algunas veces como “vaciada” con respecto al ácido láctico libre. De manera similar, cuando la corriente enriquecida de sal de lactato resulta de la separación de la sal de lactato de una mezcla que contiene el ácido láctico libre y la sal de lactato, la mezcla restante algunas veces se denominará como “vaciada” con respecto a la sal de lactato.

Preferiblemente, cuando la solución procesada es un caldo de fermentación, la corriente de producto enriquecida en sal de lactato se suministra y se forma de tal manera que la proporción en peso de las impurezas provenientes del fermentador, a la sal de lactato allí, se más baja que la encontrada en el caldo de fermentación, preferiblemente por un factor de por lo menos 5. Esto se puede manejar mediante las técnicas descritas aquí en relación con el control sobre la aproximación particular seleccionada para el aislamiento de la sal de lactato, así como también a través del uso de varias técnicas de purificación, tal como el retro lavado o recristalización.

Preferiblemente, la corriente de producto de lactato es eventualmente aislada como una solución o mezcla acuosa de una fase acuosa y una fase sólida, para el reciclamiento conveniente en un sistema de fermentación, con el fin de mantener el balance del agua. Si la concentración de una solución acuosa se utiliza con el fin de facilitar el balance de agua en el caldo, preferiblemente se utilizan técnicas de concentración relativamente de bajo costo tal como la ósmosis inversa y la re-compresión de vapor.

La invención se describirá adicionalmente con referencia a los siguientes ejemplos.

### Ejemplo 1

#### *Condiciones de Fermentación Estándar*

A menos que se indique otra cosa, las reacciones de fermentación descritas en los siguientes ejemplos se corrieron utilizando una variedad de medio de crecimiento de acuerdo con el siguiente protocolo estándar.

Las células (250 ul) pasaron de un “bench stock” de la cepa particular en 40% de jugo de tomate/40% de fase de fondo de LSW-MRS agar/fase superior MRS bifásica (TJ-SW-MRS bifásica) en un medio bifásico TJ-SW-MRS fresco e incubado bajo condiciones estáticas durante 18-24 horas a 47°C.

#### Medio MRS (pH = 6.2)

10 g/L	compendio pancreático de gelatina
8 g/L	extracto de carne
4 g/L	extracto de levadura
20 g/L	glucosa
2 g/L	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
1 g/L	Tween <sup>R</sup> 80
5 g/L	acetato de sodio
5 g/L	citrato de amonio
0.2 g/L	MgSO <sub>4</sub>
0.05 g/L	MnSO <sub>4</sub>

Una alícuota de 1.0 ml del incubado en el medio bifásico TJ-SW-MRS fresco se utilizó para inocular 80 ml del Medio B suplementado con 10% de CSL, glucosa (60 g/L de concentración total) y carbonato de calcio (20 g/L) en una botella de suero sellada e incubada con agitación 18 horas a 47°C en un agitador ambiental.

## ES 2 313 754 T3

### Medio B (pH = 4.7)

	8-12 vol.%	Licor para empapar maíz
	5 g/L	extracto de levadura
5	50-100 g/L	glucosa
	2 g/L	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	1 g/L	Tween <sup>R</sup> 80
	2 g/L	citrato de amonio
10	0.2 g/L	MgSO <sub>4</sub>
	0.05 g/L	MnSO <sub>4</sub>
	20-40 g/L	CaCO <sub>3</sub>

15 Los fermentadores que contienen el Medio B con los niveles deseados de glucosa y carbonato de calcio (por ejemplo, 90 g/L de glucosa y 33.4 g/L de carbonato de calcio) se inocularon con 10% (v/v) del cultivo de 18 horas. La fermentación se corrió a 47-49°C con agitación a 150 rpm y los jarros de fermentación 70-80% llenos. El corrimiento de los jarros de fermentación en este nivel de volumen líquido aseguró que el medio no se volviera altamente aeróbico.

### 20 Ejemplo 2

#### *Aislamiento de las Cepas Homolácticas Tolerantes a Ácido sin Control de pH*

25 Las cepas bacterianas homolácticas se aislaron de las muestras de agua para empapar maíz obtenida de ocho diferentes instalaciones de molienda de maíz industrial. Las instalaciones se localizaron en Blair, Nebraska; Edyville, Iowa; Cedar Rapids, Iowa; Dayton, Ohio; Memphis, Tennessee; Estambul Turquía; Tillbury, Inglaterra; y Bergen Op Zoon, Holanda.

30 Las cepas se aislaron al obtener muestras del agua de empapamiento proveniente de las instalaciones de molienda de maíz comercial. Las muestras se pusieron en placas sobre placas de 10% de CSL-MRS agar (pH 5.0) e incubadas anaeróbicamente a 47°C. Las colonias se restreaked para aislamiento sobre placas con 10% de CSL-MRS agar. Los aislados se pasaron entonces a un medio bifásico de 40% LSW- 40% jugo de tomate - fase de fondo MRS/fase superior MRS (pH 6.0) con propósitos de mantenimiento. Las cepas aisladas se seleccionaron para la producción heteroláctica al monitorear la formación de gas (CO<sub>2</sub>) en la parte inferior del tubo. Los aislados homolácticos se seleccionaron entonces en el Medio MRS suplementado con 10% en vol. de CSL y 30 g/L de glucosa para el rendimiento de lactato y la pureza óptica del lactato producido. Los resultados se muestran en la Tabla 1 adelante.

40 Las cepas bacterianas aisladas se identificaron como productoras de homolactato (“homolactato”) o productoras de heterolactato (“heterolácticas”). Con base en la fermentación en el medio MRS suplementado con 10% en vol. de licor para empapado de maíz (“CSL”), las cepas bacterianas homolácticas aisladas se caracterizaron en términos de la producción de lactato total, el pH de fermentación final y el lactato L % producido (ver Tabla 1 adelante). En razón a que aproximadamente el 50% de lactato en el licor de empapamiento de maíz agregado (“CSL”) fue típicamente lactato D, las cepas que produjeron por lo menos 70% de lactato L se consideraron como cepas productoras de lactato L. Esta presunción se confirmó mediante experimentos posteriores bajo condiciones donde los niveles de contaminación con el lactato D en el producto que surgen del agua de empapamiento presente en el medio nutriente fue inferior (por ejemplo, los niveles de producción de lactato superior o utilizar agua de empapamiento de maíz que tiene más del 80% de lactato L (como una fracción del lactato total)).

50 Las fermentaciones se llevaron a cabo a 48°C bajo las condiciones estándar descritas en el Ejemplo 1. Los resultados se muestran en la Tabla 1 de adelante.

### 55 Ejemplo 3

#### *Aislamiento de las Cepas Homolácticas Tolerantes a Ácido que Utilizan la Base Agregada*

60 Un conjunto adicional de cepas homolácticas se aisló de las muestras de agua para empapar maíz obtenidas de las instalaciones de molienda de maíz en Edyville (Iowa), Cedar Rapids (Iowa), y Blair (Nebraska). El procedimiento de aislamiento empleado fue el mismo que se describió en el Ejemplo 2. Las cepas homolácticas aisladas se caracterizaron con base en las fermentaciones llevadas a cabo en el Medio B suplementado con 10% en vol. de CSL, 90 g/L de glucosa y 33 g/L de CaCO<sub>3</sub>. La producción de lactato total y/o el porcentaje de lactato L producido se midió para este conjunto de cepas. Los resultados se muestran en la Tabla 2 de adelante.

65

# ES 2 313 754 T3

TABLA 2

Cepas Homolácticas Aisladas		
Cepa No.	g/L de lactato	% de Lac-L
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	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

## Ejemplo 4

### *Efecto de la Base Agregada sobre la Producción de Lactato*

Un número de cepas descritas en el Ejemplo 2 que se han identificado como productoras de lactato L se seleccionaron para examinar el efecto de la base agregada ( $\text{CaCO}_3$ ) sobre la producción de lactato. Las fermentaciones se llevaron a cabo a  $48^\circ\text{C}$  en medio MRS suplementado con 10% de CSL y 30 g/L de glucosa. Para las determinaciones hechas en la presencia de la base agregada, se utilizó el medio MRS suplementado con 10% de CSL, 30 g/L de glucosa y 20 g/L de  $\text{CaCO}_3$ .

TABLA 3

### *Efecto del $\text{CaCO}_3$ sobre la Producción de Lactato*

Cepa #	Producción de Lactato (g/L)	
	Base No.	20 g/L $\text{CaCO}_3$
6	21	42
10	20	32
14	23	37

# ES 2 313 754 T3

TABLA 3 (continuación)

Cepa #	Producción de Lactato (g/L)	
	Base No.	20 g/L CaCO <sub>3</sub>
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

## Ejemplo 5

### *Producción de Lactato L*

El nivel de producción de lactato L se caracterizó por un número de cepas descritas en el Ejemplo 2. Las fermentaciones se llevaron a cabo a 48°C en un medio MRS suplementado con 10% de CSL, 30 g/L de glucosa y 20 g/L de CaCO<sub>3</sub>.

TABLA 4

Cepa #	Producción de Lactato L	
	% de Lactato L	Lactato Producido (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

## ES 2 313 754 T3

### Ejemplo 6

#### *Producción de Lactato mediante las Cepas de Lactobacillus Depositadas en el ATCC*

5 La productividad del lactato de un número de cepas de *Lactobacillus* conocidas aisladas de fuentes diferentes del agua de empapamiento de maíz se examinaron. Las muestras de once cepas diferentes se obtuvieron del American Tissue Culture Collection (Rockville, Maryland) y se seleccionaron para la producción de lactato total y el pH de incubación final con base en la fermentación a 37°C en un medio MRS suplementado con 75 g/L de glucosa y 30 g/L de carbonato de calcio. Los resultados se muestran adelante en la Tabla 5. Todas las cepas exhibieron crecimiento pobre a 47°C y se inhibieron mediante la presencia de agua de empapamiento de maíz en el medio nutriente. Aunque los requisitos de nutrientes de las cepas depositadas en el ATCC son diferentes de las cepas aisladas del agua de empapamiento de maíz, varias de las cepas depositadas en el ATCC parecen ser capaces de producir concentraciones relativamente altas de ácido láctico libre. En particular el *Lactobacillus helveticus* (ATCC # 15009; 66 g/L de lactato a un pH de incubación final de 4.03), *Lactobacillus paracasei tolerans* (ATCC # 25599; 66 g/L de lactato a un pH de incubación final de 4.04), y el *Lactobacillus salivarius salivarius* (ATCC # 11741; 64 g/L de lactato a un pH de incubación final de 4.12) parece ofrecer potencial como productores de ácido láctico libre de alta productividad. La pureza óptica del lactato producido por un número de cepas se determinó. Ninguna de las cepas capaces de producir una concentración relativamente alta de ácido láctico libre fue una cepa productora de lactato L.

TABLA 5

Producción de Lactato mediante las Cepas de <u>Lactobacillus</u> ATCC				
ATCC #	<u>Lactobacillus</u>	Lac	% Lac-L	pH
12315	<i>L. delbrueckii lactis</i>	47	42	4.93
11741	<i>L. salivarius salivarius</i>	64	52	4.12
25302	<i>L. paracasei paracasei</i>	52	69	4.76
25258	<i>L. jensenii</i>	3	-	6.25
15009	<i>L. helveticus</i>	66	53	4.03
33409	<i>L. delbrueckii bulgaricus</i>	18	54	5.45
25599	<i>L. paracasei tolerans</i>	66	53	4.04
39392	<i>L. casei casei</i>	50	12	4.71
33323	<i>L. grasseri</i>	18	-	5.62
4536	<i>L. acidophilus</i>	40	-	5.43
35046	<i>L. animalis</i>	51	-	4.78

### Ejemplo 7

#### *Tolerancia del SO<sub>2</sub> de la Cepa Homoláctica #41*

50 El efecto de los niveles variantes de dióxido de azufre (SO<sub>2</sub>) sobre la productividad del lactato de la cepa homoláctica #41 se examinó. Los efectos de la concentración variante de dióxido de azufre sobre la producción de lactato se examinaron utilizando la cepa #41. Las fermentaciones se llevaron a cabo en el Medio MRS suplementado con 10% en vol. de CSL, 30 g/L de glucosa y 20 g/L de CaCO<sub>3</sub> por vía del protocolo de fermentación estándar descrito en el Ejemplo 1. Los resultados mostrados en la Tabla 6 de adelante demuestran que la cepa #41 es capaz de producir lactato en la presencia de concentraciones de SO<sub>2</sub> de hasta por lo menos aproximadamente 600 ppm. En la fermentación similar llevada a cabo en la presencia de 800 ppm, la cepa #41 inició la producción de lactato después de una fase formante de 144 horas.

TABLA 6

#### *Tolerancia de SO<sub>2</sub> de la Cepa Homoláctica #41*

Conc. de SO <sub>2</sub>	Producción de Lactato (g/L)		
	24 hr.	48 hr.	72 hr.
200 ppm	11	48	66
400 ppm	9	27	55
600 ppm	9	11	43

## ES 2 313 754 T3

### Ejemplo 8

#### *Efecto de la Temperatura sobre la Producción de Lactato*

5 La productividad de lactato de la cepa homoláctica #41 se determinó en un rango de temperaturas entre 41°C y 54°C. Las fermentaciones se llevaron a cabo en un Medio B suplementado con 10% en vol. de CSL, 60 g/L de glucosa y 20 g/L de carbonato de calcio. Los resultados mostrados en la Tabla 7 de adelante establecen que el rango de temperatura óptima para la producción de lactato por la cepa #41 es de 44°C a 54°C.

10 TABLA 7

#### *Dependencia de la Temperatura de la Producción de Lactato*

Temp. (°C)	Producción de Lactato (g/L)		
	24 hr.	48 hr.	72 hr.
41°	14	51	68
44°	25	55	68
47°	26	50	63
50°	31	52	57
54°	9	19	23

### Ejemplo 9

#### *Efecto de la Concentración de Agua de Empapamiento sobre la Producción de Lactato*

30 Se condujeron fermentaciones que emplean un número de cepas productoras de lactato L descritas en el Ejemplo 2 para examinar el efecto de varias cantidades de licor de empapamiento de maíz en el medio de crecimiento sobre la producción de lactato. Las fermentaciones se condujeron a 48°C en un Medio A (ver adelante) suplementado con 50 g/L de glucosa, 20 g/L de CaCO<sub>3</sub>, y 1%, 5% o 10% de CSL.

#### Medio A (pH = 5.0)

10 g/L	Extracto de levadura
0.2%	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
1 g/L	Tween <sup>R</sup> 80
.2 %	citrato de amonio
0.005 %	MnSO <sub>4</sub> 4H <sub>2</sub> O
0.02 %	MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O
	carbón agregado/fuente de energía
	fuente de nitrógeno agregado
	CaCO <sub>3</sub> agregado para modular el pH

55 TABLA 8

#### *Efecto del Agua Empapamiento sobre la Producción de lactato*

Cepa #	Producción de Lactato (g/L)		
	1 % de CSL	5% de CSL	10% de CSL
10	1	19	31
23	1	10	32
24	1	6	22
41	1	9	33
45	1	8	35



## ES 2 313 754 T3

### Ejemplo 10

#### *Caracterización de las Cepas Homolácticas con Base en el Ribotipo*

5 Un número de cepas bacterianas homolácticas que producen lactato L aisladas del agua de empapamiento de maíz se categorizaron con base en el análisis de patrón de riboimpresión (ver, por ejemplo, Jaquet *et al.*, *Zbl. Bakt.*, 276, 356-365 (1992)). Esta técnica se basa en la digestión de ADN proveniente de una colonia única de la cepa en cuestión utilizando una enzima de restricción EciRI y la hibridización después de la separación de tamaño sobre un gel de agarosa con un operón rARN químicamente marcado de *E. coli*. El patrón resultante es un indicador directo de las relaciones genéticas entre los organismos y que se ha utilizado para suministrar la identificación entre cuatro géneros de bacterias (*Samonella*, *Listeria*, *Staphylococcus* y *E. coli*) así como también la identificación taxonómica de de las cepas gram positivas y gram negativas cercanamente relacionadas.

15 Los resultados del ribotipo de siete de las cepas productoras de lactato aisladas del agua de empapamiento de maíz se muestran en la Figura 2. Las cepas dadas en la designación del mismo RiboGrupo son probablemente identificadas en el mismo nivel de taxón como idénticas. Los ribotipos exhibidos por las siete cepas mostradas en la Figura 2 no coinciden con los patrones de cualquiera de las 30 diferentes cepas bacterianas de ácido láctico en una base de datos de computadora del laboratorio comercial. Entre las cepas en la base de datos que no suministran una coincidencia estuvieron el *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus animalis*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus helveticus*, 20 *Lactobacillus amylovorus* y *Lactobacillus salivarius*. Los ribotipos de las cepas listadas en la Figura 2 tampoco suministran una coincidencia con los patrones del *Lactobacillus agilis*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus confusus*, *Lactobacillus coryniformis*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus farciminis*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus murinus*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus sake*, y *Lactobacillus suebicus*. Los patrones del ribotipo mostrados en la Figura 2 tampoco suministraron una coincidencia con el *Lactococcus garviae*, *Lactococcus lactis*, y *Lactococcus affinolactis* o con *Leuconostoc carnosum*, *Leuconostoc citreum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc paramesenteroides*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus dextrinicus* y *Pediococcus pentoxaceus*.

30 Los patrones del ribotipo de siete cepas mostrados en la Figura 2 caen en los tres RiboGrupos. Dos cepas (#114 y #119) tienen ribotipos idénticos. Una de estas cepas es una cepa heteroláctica (#119) mientras la otra es una cepa homoláctica que produce lactato racémico (#114). La una cepa productora de lactato D (#79) exhibió un patrón de ribotipo que fue diferente de los otros seis. Las restantes cuatro cepas (#90, 127, 132 y 140) se clasificaron en el mismo RiboGrupo y se consideraron probablemente como idénticas en el mismo nivel de taxón, a pesar del hecho de que sus patrones de ribotipo no fueron idénticos. De las cuatro cepas con un patrón MIL 4-1132, tres fueron cepas productoras de lactato L (#90, 132 y 140) mientras la cuarta (#127) produjo lactato racémico.

### Ejemplo 11

#### *Efecto de la Base Agregada sobre la Producción de Lactato*

45 El efecto de la adición de cantidades varias de CaCO<sub>3</sub> sobre la productividad de lactato de la cepa homoláctica #41 se examinó. Los experimentos se llevaron a cabo a 47°C en un Medio A suplementado con 8% en vol. de CSL, 200 g/L de glucosa, y cantidades variantes de carbonato de calcio agregado (30-90 g/L). Los resultados se muestran en la Tabla 9 de adelante.

TABLA 9

#### *Efecto de CaCO<sub>3</sub> sobre la Producción de Lactato*

		Producción de Lactato CaCO <sub>3</sub> (g/L)				
	Conc.	0 hr.	24 hr.	51 hr.	120 hr.	pH final
55	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	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
65	90 g/L	5.39	49.6	57.8	83.6	4.74

## ES 2 313 754 T3

### Ejemplo 12

*Perfil de Fermentación de la Cepa #41 con 12% de CSL, 90 g/L de Glucosa y 33.4 g/L de CaCO<sub>3</sub>*

5 La Figura 3 muestra el perfil del pH y los componentes orgánicos en el caldo de fermentación como una función del tiempo durante el curso de un experimento de fermentación representativo. El perfil mostrado en la Figura 3 se basa en los resultados obtenidos de la incubación a 47°C de la cepa #41 en el Medio B suplementado con 10% en vol. de CSL, 100 g/L de glucosa y 33.4 g/L de carbonato de calcio.

### 10 Ejemplo 13

*Perfil de Fermentación de la Cepa #41 con 90 g/L de Glucosa, 33.4 g/L de CaCO<sub>3</sub> y 12% de CSL/36% de LSW*

15 La Figura 4 muestra la producción de lactato como una función del tiempo durante el curso de los experimentos de fermentación representativos con la cepa #41. Las fermentaciones se llevaron a cabo utilizando el procedimiento descrito en el Ejemplo 1. El perfil mostrado en la Figura 4 se basa en los resultados obtenidos de la incubación de la cepa #41 a 47°C en el Medio C suplementado con 90 g/L de glucosa, 33.4 de carbonato de calcio y 12% en vol de CSL (36% en peso de sólidos secos) o 36% en vol. de LSW (12% en peso de sólidos secos). Los resultados resumidos en la  
20 Tabla 10 de adelante muestran los niveles de ácido láctico libre final de aproximadamente 40 g/L libre con cualquier fuente de agua de empapado de maíz. En razón a que el lactato se produjo con una cepa productora de lactato L (#41), por lo menos aproximadamente 35 g/L de ácido láctico libre estaba presente al final de estas fermentaciones (el resto es lactato D libre presente en el agua de empapado agregada).

25 TABLA 10

*Producción de Lactato con la Cepa #41*

	Fuente de Agua de Empapado de Maíz	
	12% de CSL	36% de LSW
<b>Lactato (g/L)</b>		
0 hrs.	10.3	8.4
35 16 hrs.	44.0	52.4
24 hrs.	80.5	92.2
44 hrs.	91.5	96.8
40 pH Final	3.92	3.98
<b>Lactato Libre Final</b>	<b>42</b>	<b>41</b>

### Ejemplo 14

*Producción de Lactato de la Cepa #41 con 8-12% de CSL, 90 g/L de Glucosa y 36.6 g/L de CaCO<sub>3</sub>*

50 La Figura 5 muestra la producción de lactato como una función del tiempo durante el curso de los experimentos de fermentación representativos con la cepa #41. Las fermentaciones se llevaron a cabo utilizando una versión modificada del procedimiento descrito en el Ejemplo 1. Las células de la cepa #41 fueron pre-crecidas en 800 ml del medio y luego separadas del medio. Las células pre-crecidas se resuspendieron entonces en 800 ml del medio fresco. El perfil mostrado en la Figura 5 se basa en los resultados obtenidos de la incubación de las células pre-crecidas a 47°C en el Medio B suplementado con 90 g/L de glucosa, 36.6 g/L de carbonato de calcio, y 8% en vol. de CSL (36% en peso de sólidos secos), 12% en vol. de CSL, 24% en vol. de LSW (12% en peso de sólidos secos), o 36% en vol. de LSW.

55 TABLA 11

*Producción de Lactato con la Cepa #41*

	Fuente de Agua de Empapado de Maíz	pH final	Lactato	Láctico libre
	8% CSL	3.83	93 g/L	47 g/L
	24% LSW	3.90	94 g/L	44 g/L
65	12% CSL	3.80	97 g/L	52 g/L
	36% LSW	3.81	99.5 g/L	53 g/L

## ES 2 313 754 T3

### Ejemplo 15

#### *Efecto de la Glucosa Agregada sobre la Producción de Lactato*

5 Los efectos que varían las cantidades de una fuente de carbohidrato agregada (glucosa) sobre la producción de lactato se examinó para la cepa homoláctica #41. Las fermentaciones se corrieron al incubar la cepa #41 a 48°C en el Medio A suplementado con 10% de vol. de CSL, 20 g/L de CaCO<sub>3</sub> y el nivel indicado de glucosa utilizando el procedimiento de fermentación estándar descrito en el Ejemplo 1. El medio también contenía 1-15 g/L de azúcar fermentable adicional (principalmente glucosa y fructosa) del licor de empapado de maíz. Los resultados se muestran  
10 en la Tabla 12 de adelante. Los resultados de este experimento sugieren que por lo menos para el nivel de la base agregado (20 g/L de CaCO<sub>3</sub>), la productividad de lactato se puede mejorar mediante la adición de por lo menos 50 g/L de una fuente de carbohidrato tal como glucosa.

15

TABLA 12

#### *Efecto de la Glucosa sobra la Producción de Lactato*

20

25

Glucosa Agregada	Producción de Lactato (g/L)		
	24 hr.	48 hr.	72 hr.
30 g/L	14	39	42
50 g/L	11	51	55
80 g/L	11	50	67
100 g/L	9	47	65

30

La invención se ha descrito con referencia a varias de las modalidades y técnicas específicas y preferidas. La invención no se debe considerar, sin embargo, como limitada a las modalidades específicas descritas en la especificación. Se debe entender que muchas variaciones y modificaciones se pueden hacer aunque permaneciendo dentro del espíritu y alcance de la invención.

35

40

45

50

55

60

65

TABLA 1			
Cepas Homolácticas Aisladas			
Cepa No.	g/L Lactato	pH	% Lactato L
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

ES 2 313 754 T3

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
32	20.4	4.15	46
34	19.5		41
35			40
(continuación)			
Cepas Homolácticas Aisladas			
Cepa No.	g/L Lactato	pH	% Lactato L
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
66			4
67			5

ES 2 313 754 T3

68			5
69			49
(continuación)			
Cepas Homolácticas Aisladas			
Cepa No.	g/L Lactato	pH	% Lactato L
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		35

## ES 2 313 754 T3

### REIVINDICACIONES

1. Un proceso para producir ácido láctico que comprende:
  - 5 suministrar un medio nutriente;
  - inocular el medio nutriente con microorganismos productores de lactato tolerantes a ácido; e
  - 10 incubar los microorganismos productores de lactato tolerantes a ácido en el medio nutriente a un pH de incubación promedio de no más de 4.2 para generar una solución que incluye por lo menos 50 g/L de lactato de un pH de incubación final de 4.3 o inferior, en donde el lactato tiene una pureza óptica de por lo menos 50%.
2. El proceso de la reivindicación 1, en donde dichos microorganismos productores de lactato tolerantes a ácido son bacterias homolácticas tolerantes a ácido, particularmente un *Lactobacillus* homoláctico tolerante a ácido.
3. El proceso de la reivindicación 1 o 2, en donde la temperatura de incubación es de por lo menos 43°C, preferiblemente 45°C a 52°C.
- 20 4. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la temperatura de incubación es de 47°C a 50°C.
5. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende incubar las bacterias homolácticas tolerantes a ácido en el medio de nutriente para generar una solución a un pH de incubación final de 4.3 o inferior, que incluye por lo menos 50 g/L de lactato L o a por lo menos 50 g/L de lactato D.
- 25 6. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el medio nutriente incluye por lo menos 15 g/L de sólidos secos del agua de empapado de maíz.
- 30 7. El proceso de una de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el medio nutriente comprende por lo menos 50 g/L de carbohidrato que incluye glucosa, fructosa, galactosa, melibiosa, sacarosa, rafinosa, estaquiosa, o una mezcla de éstos.
8. El proceso de una de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende incubar la bacteria en el medio nutriente a un pH de incubación promedio de 4.3 o inferior para generar una solución que incluye por lo menos 75 g/L de lactato L.
- 35 9. El proceso de una de las reivindicaciones 1 a 8 en donde el medio nutriente comprende una base.
10. El proceso de la reivindicación 9, en donde la base comprende carbonato de calcio, hidróxido de sodio, hidróxido de amonio, bicarbonato de sodio o una mezcla de éstos.
- 40 11. El proceso de una de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el medio nutriente comprende una sal de lactato.
12. El proceso de la reivindicación 11 en donde la sal de lactato comprende lactato de calcio, lactato de sodio, lactato de amonio o una mezcla de éstos.
- 45 13. El proceso de una de las reivindicaciones 1 a 12, que comprende incubar la bacteria en el medio nutriente para producir lactato L que tiene una pureza óptica de por lo menos 80%.
14. El proceso de una de las reivindicaciones 1 a 13, que comprende incubar la bacteria en el medio nutriente para producir lactato a una tasa total de por lo menos 2.0 g/L/hr.
- 50 15. El proceso de una de las reivindicaciones 1 a 14, que comprende incubar la bacteria homoláctica tolerante a ácido en el medio nutriente para generar una solución a un pH de incubación final de no más de 4.0 que incluye por lo menos 50 g/L de lactato L o por lo menos 50 g/L de lactato D.
- 55 16. El proceso de una de las reivindicaciones 1 a 15, que comprende incubar la bacteria en el medio nutriente que tiene un pH de incubación promedio de no más de 4.2.
17. El proceso de una de las reivindicaciones 1 a 16, que comprende además:
  - 60 incubar los microorganismos productores de lactato tolerante a ácido en una primera porción del medio nutriente para producir una primera solución de producto que incluye por lo menos 50 g/L de lactato a un pH de incubación final de 4.3 o inferior, en donde el lactato en la primera solución del producto tiene una pureza óptica de por lo menos 50%;
  - 65 separar la primera solución de producto para producir (i) una primera fracción que incluye lactato y está sustancialmente libre de los microorganismos, y (ii) una segunda fracción que incluye los microorganismos; y procesar la primera fracción para producir una tercera fracción con vaciamiento de ácido láctico y una cuarta fracción enriquecida con ácido láctico.

## ES 2 313 754 T3

18. El proceso de la reivindicación 17, que comprende además formar una mezcla que incluye (i) por lo menos una porción de la tercera fracción; (ii) una segunda porción del medio nutriente; y (iii) los microorganismos; e

5       incubar la mezcla para producir una segunda solución del producto que incluye por lo menos 50 g/L de lactato a un pH de incubación final de 4.3 o inferior, en donde el lactato en la segunda solución del producto tiene una pureza óptica de por lo menos 50%.

10       19. El proceso de la reivindicación 17 o 18, en donde la tercera fracción con vaciamiento de ácido láctico incluye sal de lactato.

20. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, que comprende además:

15       incubar microorganismos productores de lactato tolerantes a ácido en una primera porción del medio nutriente para producir una solución del producto que incluye por lo menos 50 g/L de lactato a un pH de incubación final de 4.3 o inferior, en donde el lactato en la solución del producto tiene una pureza óptica de por lo menos 54%; y

      procesar la solución del producto para producir una fracción con vaciamiento de ácido láctico y una fracción enriquecida con ácido láctico.

20

25

30

35

40

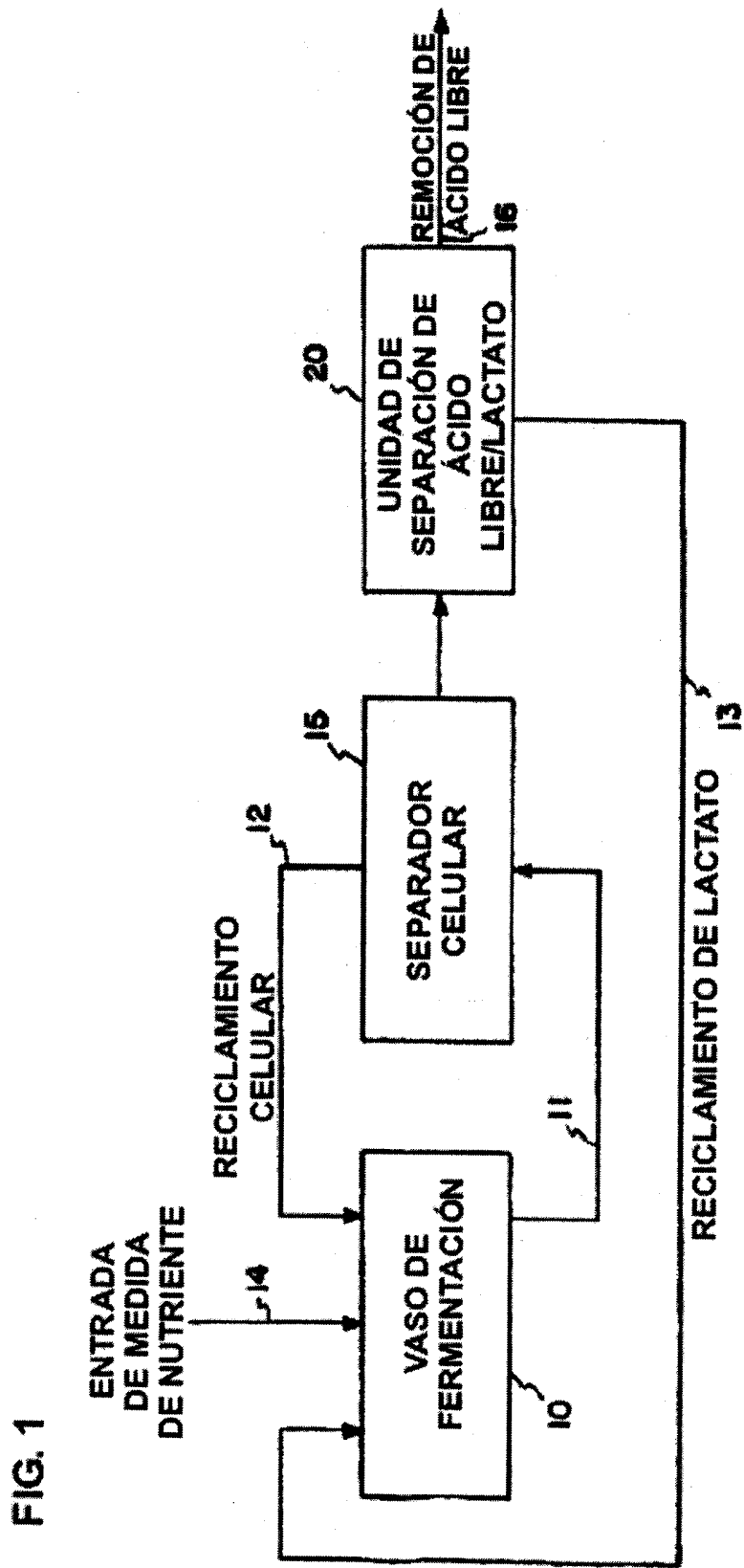
45

50

55

60

65





**FIG. 2**

<b>GRUPO RIBO</b>	<b>CEPA #</b>
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

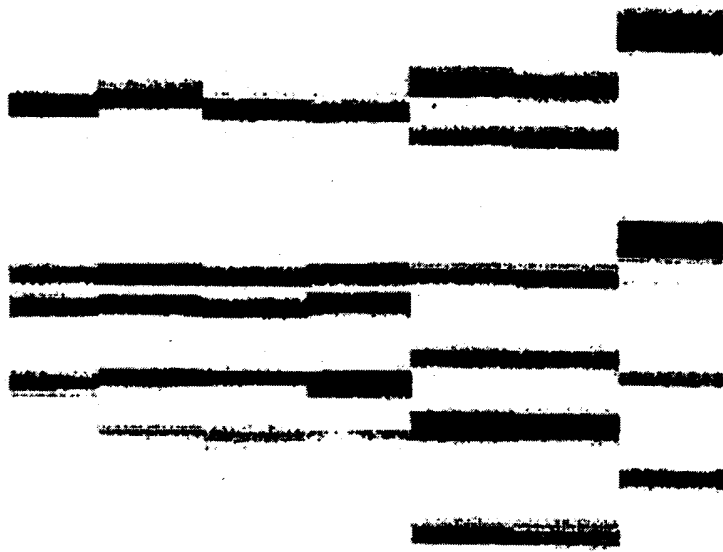


FIG. 3

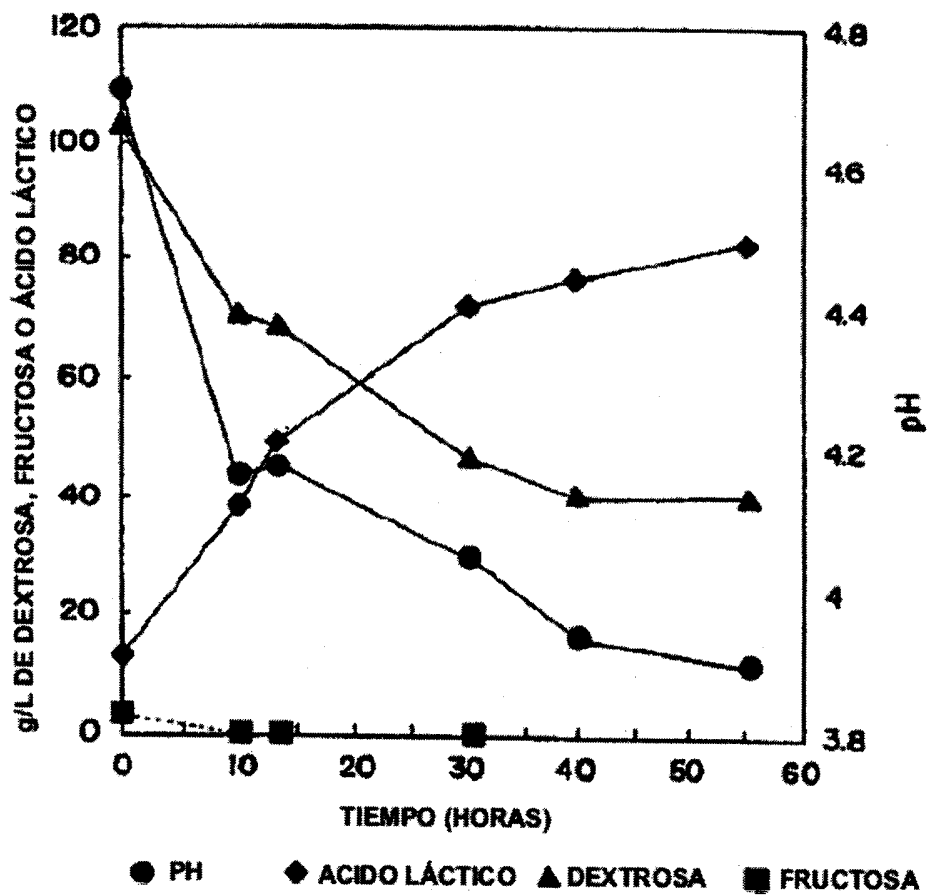


FIG. 4

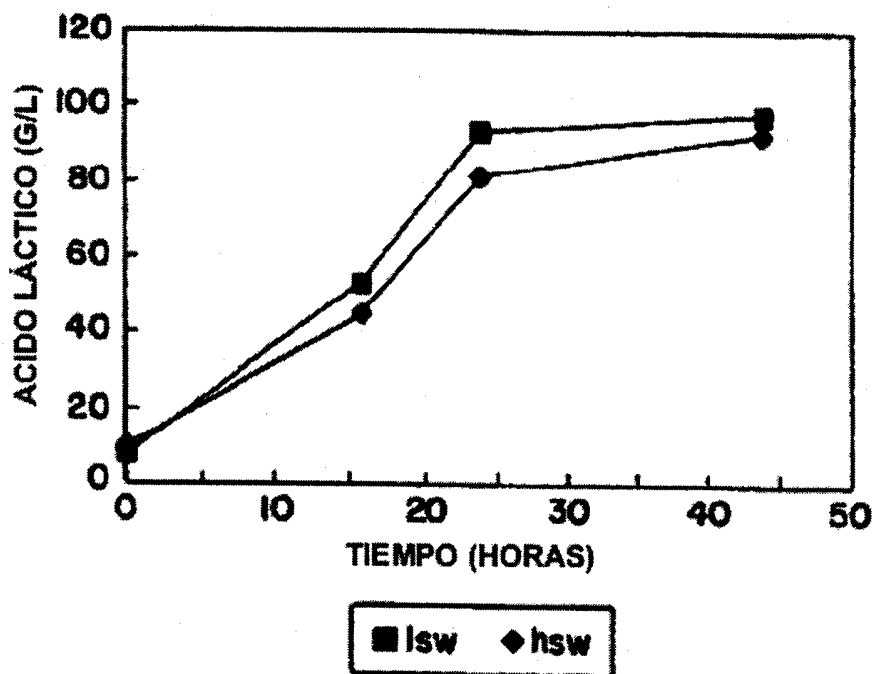


FIG. 5

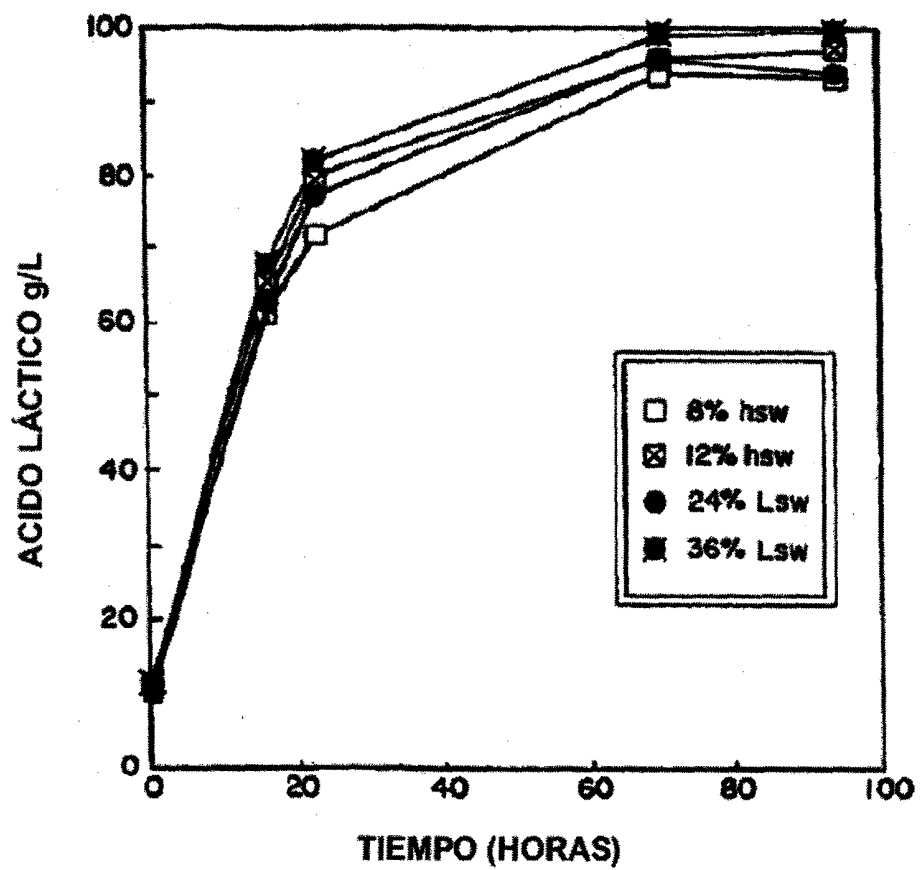


FIG. 6

