

(12)

PATENTSCHRIFT

(21) Anmeldenummer: 555/89

(51) Int.Cl.⁵ : **C12N 1/20**
C12P 7/56, //(C12N 1/20, C12R 1:07)

(22) Anmeldetag: 10. 3.1989

(42) Beginn der Patentdauer: 15. 3.1990

(45) Ausgabetag: 25. 9.1990

(73) Patentinhaber:

JUNGBUNZLAUER AKTIENGESELLSCHAFT
A-1010 WIEN (AT).

(72) Erfinder:

KIRKOVITS AUGUST ERNST DIPL.ING.
STRONEGG, NIEDERÖSTERREICH (AT).
EDLAUER HELGA
LAA AN DER THAYA, NIEDERÖSTERREICH (AT).-

(54) MIKROORGANISMUS DER SPECIES BACILLUS COAGULANS SOWIE EIN VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON OPTISCH REINER L(+)-MILCHSÄURE

(57) Vorgeschlagen wird ein Mikroorganismus der Spezies *Bacillus coagulans* DSM 5196 sowie ein Verfahren zur Herstellung von L(+)-Milchsäure, bei dem dieser eingesetzt wird.

Die Erfindung betrifft einen Mikroorganismus der Species *Bacillus coagulans* sowie ein Verfahren zur Herstellung von optisch reiner L(+)-Milchsäure durch Kultivieren dieses Mikroorganismus in oder auf einem geeigneten Nährmedium, wobei man eine L(+)-milchsäurehaltige Kulturflüssigkeit erhält, aus der vorzugsweise die gebildete L(+)-Milchsäure isoliert wird.

- 5 Zur Herstellung von Milchsäure geeignete Nährmedien enthalten üblicherweise neben diversen Wachstoffsstoffen, wie Spurenelemente und Vitamine, und verwertbaren Kohlehydraten auch verschiedene Stickstoffquellen, wobei als organische N-Quelle vorzugsweise Hefeextrakt oder Maisquellwasser dient.

Die Herstellung von Milchsäure aus diversen kohlehydrathaltigen Ausgangsmaterialien unter Zusatz verschiedenster Stickstoffquellen, Phosphorverbindungen, Vitaminen und anderen produktionsfördernden Stoffen ist seit der Jahrhundertwende bekannt.

10 Als eine der ersten beschäftigt sich die FR-PS 679 418 aus dem Jahre 1929 mit diesem Verfahren. Nachfolgend werden in der EP-PS 69 291 der Einsatz von Hefen sowie in der EP-A 0 113 215 aus dem Jahre 1984 die Produktion von Milchsäure durch Bakterien der Species *Lactobacillus* beschrieben. Neuere Arbeiten beschäftigen sich mit Verfahrensoptimierungen, die vor allem durch Eintrag spezieller Stickstoffquellen gekennzeichnet sind, wie beispielsweise in der EP-PS 0 266 258 (1988). Auch hier gehört der milchsäureproduzierende Mikroorganismus der Genera *Lactobacillaceae* an.

15 Alle diese Verfahren haben jedoch nicht in befriedigendem Maße dem zunehmenden Bedarf an optisch reiner L(+)-Milchsäure Rechnung tragen können, der sich neben dem Einsatz in der Nahrungs- und Genußmittelindustrie aus der Verwendung von Milchsäure zur Herstellung biologisch abbaubarer Kunststoffe ergibt.

20 Es bestand somit die Aufgabe, ein Verfahren zur Produktion von optisch reiner L(+)-Milchsäure zu entwickeln, wobei besonders Stickstoffeintrag und Gärzeit zu minimieren waren. Gleichzeitig sollte eine Umsetzung von sowohl Glucose als auch Saccharose möglich sein, ungeachtet dessen, ob es sich dabei um reine Rohstoffe oder beispielsweise Melasse handelt.

25 Dazu wurde eine gezielte Isolierung von milchsäurebildenden Bakterien aus pflanzlichem Material durchgeführt.

30 Dabei konnte aus Silage ein Mikroorganismus isoliert werden, der zur Familie der *Bacillaceae* gehört. Überraschenderweise konnten durch gezielte Anreicherungsverfahren die Stoffwechselleistungen des Bakteriums dermaßen gesteigert werden, daß er in der Lage ist, Kohlehydrate, vorzugsweise Glucose oder Saccharose, im Gegensatz zu bisher publizierten Verfahren, bei Anfangskonzentrationen von mehr als 140 g/l in L(+)-Milchsäure umzusetzen.

Untersuchungen dieses erfindungsgemäßen Mikroorganismus führten zu dessen Identifizierung als *Bacillus coagulans* und nachfolgend aufgelisteter taxonomischer Charakteristika:

- | | | |
|----|---|---------|
| 35 | - Gram positive Stäbchen mit einer Größe von 1,5-4 x 0,4-0,8 µm | |
| | - Bildung von ellipsoid bzw. zylindrischen Sporen | |
| | - nicht beweglich | |
| | - aerob bis facultativ anaerob | |
| | - Wachstum bei 30 - 60 °C | |
| 40 | optimale Temperatur bei 48 - 54 °C | |
| | - Wachstum bei pH 4,5 - 7,0 | |
| | optimaler pH-Bereich zwischen 5,8 und 6,2 | |
| | - Katalase: positiv | |
| 45 | - Säurebildung aus | |
| | D-Glucose | positiv |
| | L-Arabinose | negativ |
| | D-Xylose | negativ |
| | D-Mannit | negativ |
| | Lactose | positiv |
| 50 | - Gasbildung aus Glucose: | negativ |
| | - Desaminierung von Phenylalanin: | negativ |
| | - Reduktion von Nitrat: | negativ |
| | - Verwertung von Citrat oder Propionat: | negativ |
| | - Abbau von Stärke | positiv |
| 55 | Casein | negativ |
| | Gelatine | negativ |
| | Tyrosin | negativ |
| | DNA | positiv |
| 60 | - Bildung von Indol: | negativ |
| | - Gärungsverhalten: homofermentative L(+)-Milchsäurebildung | |

Der durch oben angeführte Daten gekennzeichnete Stamm wurde bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen gemäß den Bestimmungen des Budapester Abkommens am 31. 1. 1989 mit der Nummer DSM 5196 hinterlegt.

Es wurde gefunden, daß der erfindungsgemäße Mikroorganismus in der Lage ist, bei Temperaturen von bis zu etwa 60°C Milchsäure zu bilden; dementsprechend besteht ein weiteres Kennzeichen des erfindungsgemäßen Verfahrens darin, daß die Kultivierung des Mikroorganismus bei Temperaturen im Bereich von 30 bis 60°C, vorzugsweise im Bereich von 48 bis 54°C, insbesondere bei etwa 52°C, durchgeführt wird.

Weiterhin wurde gefunden, daß bei höheren Temperaturen, insbesondere zwischen 50 und 60°C, eine sterile Fahrweise nicht nötig ist, insbesondere eine Sterilisierung des Nährmediums (z. B. Erhitzen auf 121°C während 15 min) unterbleiben kann. Ein weiteres Kennzeichen des erfindungsgemäßen Verfahrens ist somit, daß die Kultivierung des Mikroorganismus unter nichtsterilen Bedingungen durchgeführt wird.

Die Kultivierung des Mikroorganismus erfolgt weiterhin vorteilhaft unter aeroben Bedingungen.

Wie z. B. aus der EP-A 0 266 258 hervorgeht, war es bisher nicht möglich, mit Zuckerausgangskonzentrationen über 140 g/l zu arbeiten. Wie schon eingangs erwähnt, ist der erfindungsgemäße Mikroorganismus in der Lage, höherliegende Zuckerkonzentrationen zu verarbeiten.

Ein weiteres Kennzeichen des erfindungsgemäßen Verfahrens ist demgemäß, daß die Kultivierung des Mikroorganismus in oder auf einem Medium durchgeführt wird, dessen Zuckerausgangskonzentration über 140 g/l, bevorzugt zwischen 180 und 200 g/l, insbesondere bei etwa 190 g/l, liegt.

Technisch heißt dies vor allem, daß die gesamte zu vergärende Zuckermenge vorgelegt werden kann, das erfindungsgemäße Verfahren also als batch-Verfahren durchgeführt werden kann, zum Unterschied von bekannten Verfahren wie z. B. nach der EP-A 0 072 010, bei dem während der Kultivierung kontinuierlich oder diskontinuierlich Zucker nachgegeben wird.

Weiterhin wurde herausgefunden, daß das Nährmedium beim erfindungsgemäßen Verfahren einen weitaus geringeren Gehalt an organischem und anorganischem Stickstoff aufweisen muß als bisher.

Weitere Kennzeichen des erfindungsgemäßen Verfahrens sind somit einerseits, daß die Kultivierung des Mikroorganismus in oder auf einem Medium durchgeführt wird, dessen Gehalt an Maisquellwasser höchstens bei etwa 30 g/l oder an Hefeextrakt bei etwa 3 g/l liegt, woraus sich ein Gehalt an Aminostickstoff von 0,15 bis 0,4 g/l ergibt und andererseits, daß die Kultivierung des Mikroorganismus in oder auf einem Medium durchgeführt wird, das höchstens etwa 3 g/l Ammonphosphat enthält.

Dies hat zur Folge, daß die gebildete L(+)-Milchsäure durch weitaus weniger aufwendige Verfahren als bisher aus dem Kulturmedium isoliert und gewonnen werden kann. Es genügt z. B. die Neutralisierung mit $\text{Ca}(\text{OH})_2$, worauf $\text{CaL}(+)\text{-Lactat}$ auskristallisiert.

Gegebenenfalls können beim erfindungsgemäßen Verfahren Maßnahmen zur Schaumbekämpfung nötig sein.

Nachfolgende Beispiele dienen der näheren Beschreibung der Erfindung:

Beispiel 1: Isolation und Verbesserung des Stammes *Bacillus coagulans*

Pflanzliches Material wurde unter Luftabschluß bei 50°C während 7 Tagen inkubiert, danach in sterilem Wasser aufgenommen, geschüttelt und filtriert. Das resultierende Filtrat wurde soweit verdünnt, daß nach dem Überimpfen auf Petrischalen, welche Medium 1 enthalten, und Inkubation bei 50°C +/- 2°C Einzelkolonien vorlagen.

Medium 1: (Nähragar CM 3 Oxoid)

Fleischextrakt	1 g/l
Hefeextrakt	2 g/l
Pepton	5 g/l
NaCl	5 g/l
Glucose	10 g/l
Saccharose	10 g/l
Agar	15 g/l

Nach 48 h wurden etwa 200 Kolonien isoliert und hinsichtlich ihrer Fermentationsleistung überprüft: Je 10 ml Medium 2 wurde mit entsprechendem Isolat beimpft und 5 Tage bei 50°C +/- 2°C bebrütet. Danach wurde die Milchsäurekonzentration enzymatisch in jedem Ansatz bestimmt.

Medium 2:	Saccharose	120 g/l
	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	1,5 g/l
	CaCO_3	70 g/l
	Hefeautolysat	5 g/l

Jenes Isolat, welches den höchsten Gehalt an L(+)-Milchsäure aufwies, wurde für die weiteren Selektionsarbeiten herangezogen. Von diesem Isolat wurden wieder Kolben mit Medium 2 beimpft, wobei

Saccharose durch Glucose ersetzt und die Konzentration an Kohlehydraten um 10 g/l erhöht wurde. Die Inkubation wurde während 4 Tagen bei 50°C durchgeführt. Dieses Verfahren wurde solange wiederholt, bis jeweils 190 g/l Saccharose bzw. Glucose innerhalb von 4 Tagen zu L(+)-Milchsäure umgesetzt worden sind.

Die Stammerhaltung erfolgte auf Medium 1 oder durch Lagerung der Kulturen bei -15°C.

Beispiele 2 - 5: Produktion von L(+)-Milchsäure

Gemäß Beispiel 1 hergestellte Kulturen wurden auf Medium 3 übertragen, wobei darauf zu achten war, daß eine Inokulationsmenge von 1 % nicht unterschritten wird.

Medium 3:

Kohlehydrate: 190 g/l bezogen auf Glucoseäquivalent

(in Beispiel 2 + 4: Saccharose

in Beispiel 3 + 5: Glucose)

anorganischer Stickstoff: 1,5 g als $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$

organischer Stickstoff: 3 g/l als Hefeautolysat (in Beispiel 2 + 3), wobei als durchschnittlicher Gehalt an Aminostickstoff 4,8 - 5,8 % bzw. an Protein ($\text{N} \times 6,25$) 56 - 62 % bei einer Trockensubstanz von 94 - 98 % angenommen wird,

oder: 30 g/l als Maisquellwasser (in Beispiel 4 + 5), wobei als durchschnittlicher Gehalt an Aminostickstoff 2 - 3 % bzw. an Protein ($\text{N} \times 6,25$) 43 - 49 % bei einer Trockensubstanz von 45 % angenommen wird.

Die Produktionslösung wurde mittels geeigneter Vorkehrungen bei einer Temperatur von 52°C konstant gehalten und die Rührung so gewählt, daß eine optimale Durchmischung des Mediums erfolgte. Die pH-Werteinstellung auf 6,0 erfolgte durch Zugabe von Kalkmilch.

ERGEBNISSE

KOHLEHYDRAT QUELLE	ORGANISCHE STICKSTOFF- QUELLE	GÄRZEIT (Stunden)	L(+)-MILCHSÄURE (g/l)	OPTISCHE REINHEIT (%L(+))
Beispiel 2: Saccharose	Hefeautolysat	39	140	99,8
Beispiel 3: Glucose	Hefeautolysat	49	133	99,8
Beispiel 4: Saccharose	Maisquellwasser	43	135	98,5
Beispiel 5: Glucose	Maisquellwasser	51	134	98,7

Der Anteil an D(-)-Milchsäure von 1 bis 1,5 % in Beispiel 4 und 5 ist auf die üblicherweise als Racemat vorliegende Milchsäure des Maisquellwassers zurückzuführen.

PATENTANSPRÜCHE

1. Mikroorganismus der Spezies *Bacillus coagulans* DSM 5196.

2. Verfahren zur Herstellung von L(+)-Milchsäure, **gekennzeichnet durch** die Kultivierung eines Mikroorganismus nach Anspruch 1 in oder auf einem Kohlehydrate, Stickstoff und Protein enthaltenden Medium, wobei man eine L(+)-milchsäurehaltige Kulturflüssigkeit erhält, aus der vorzugsweise die gebildete L(+)-Milchsäure isoliert wird.

3. Verfahren nach Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Kultivierung des Mikroorganismus bei Temperaturen im Bereich von 30 bis 60°C, vorzugsweise im Bereich von 48 bis 54°C, insbesondere bei etwa 52°C, durchgeführt wird. 4. Verfahren nach Anspruch 2 oder 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Kultivierung des Mikroorganismus unter nichtsterilen Bedingungen durchgeführt wird.

5

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Kultivierung des Mikroorganismus unter aeroben Bedingungen durchgeführt wird.

10

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 5, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Kultivierung des Mikroorganismus in oder auf einem Medium durchgeführt wird, dessen Zuckerausgangskonzentration über 140 g/l, bevorzugt zwischen 180 und 200 g/l, insbesondere bei etwa 190 g/l, liegt.

15

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Kultivierung des Mikroorganismus in oder auf einem Medium durchgeführt wird, dessen Gehalt an Aminostickstoff höchstens bei etwa 0,4 g/l bzw. an Protein höchstens bei etwa 6 g/l liegt.

20

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 7, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Kultivierung des Mikroorganismus in oder auf einem Medium durchgeführt wird, das höchstens etwa 3 g/l Ammonphosphat enthält.