



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 363 085**

(51) Int. Cl.:
C12N 1/20 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **04821212 .0**

(96) Fecha de presentación : **18.11.2004**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1702060**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **20.09.2006**

(54) Título: **Un método para producir ácido láctico con alta concentración y alto rendimiento utilizando las bacterias del ácido láctico.**

(30) Prioridad: **11.12.2003 KR 10-2003-0090204**

(73) Titular/es: **CJ CHEILJEDANG Corp.
CJ Building 500, 5-ga Namdaemun-ro
Jung-gu Seoul 100-802, KR**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
20.07.2011

(72) Inventor/es: **Park, Young-Hoon;
Cho, Kwang-Myung;
Kim, Hye-Won y
Kim, Dae-Cheol**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
20.07.2011

(74) Agente: **Izquierdo Faces, José**

ES 2 363 085 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).

DESCRIPCION

Un método para producir ácido láctico con alta concentración y alto rendimiento utilizando las bacterias del ácido láctico.

[Campo de la Técnica]

- 5 [0001] La presente invención se refiere a un método para producir ácido láctico utilizando las bacterias de ácido láctico. Más particularmente, la presente invención se refiere a un método para producir ácido láctico con alta concentración y alto rendimiento utilizando *Lactobacillus paracasei* CJLA0310 KCCM-10542 que es separado e identificado del Kimchi.

[Antecedentes de la técnica]

- 10 [0002] El ácido láctico es un ácido orgánico muy importante y sus aplicaciones son amplias incluyendo aditivos de comida tales como conservante de comida, condimento o acidificante, y campos industriales como cosméticos, química, metales, electrónica, tejidos, teñido de textiles, e industrias farmacéuticas. Además, el ácido láctico es un ingrediente esencial del ácido poliláctico, uno de los plásticos biodegradables. En los últimos años, ha habido varias preocupaciones tales como el incremento del precio del gas, agotamiento del petróleo y plásticos basados en petroquímicos no degradables. Estas preocupaciones han vuelto el interés de la gente hacia materiales polímeros respetuosos con el medio ambiente contra plásticos no biodegradables recalcitrantes que son las causas principales de la contaminación ambiental. Por lo tanto, la demanda de ácido láctico ha aumentado notablemente. La producción mundial de ácido láctico es de aproximadamente 100.000 toneladas cada año, anunciando alrededor de un 5% de crecimiento. Considerando el incremento gradual en los plásticos biodegradables, la demanda de ácido láctico aumentará más incluso dentro de varios años. Particularmente, el ácido láctico es un ácido orgánico muy reactivo que contiene un grupo hidroxilo y un grupo carboxílico. Es también usado como un ingrediente clave de muchos químicos incluyendo el ácido poliláctico, acetaldehído, polipropileno glicol, ácido acrílico y 2,3-pentatona. Además, el ácido láctico es usado para la preparación del lactato de etilo que es un disolvente biodegradable y no tóxico ampliamente utilizado en la fabricación de instrumentos electrónicos, pinturas o telas, detergentes, adhesivos o estampados.

- 25 [0003] Como se ha descrito anteriormente, el ácido láctico es un material industrial muy útil y valioso. Normalmente, el ácido láctico era producido a través de la síntesis química tradicional o el proceso de fermentación biológica utilizando carbohidratos como un sustrato. Lo último es preferido en muchos casos porque la síntesis química crea otros problemas además del aumento del coste de material debido al aumento del precio del gas o problemas de contaminación ambiental. Por ejemplo, la síntesis química tradicional del ácido láctico no sólo produce ácido láctico si no también un ácido láctico D, L inactivo en forma de una mezcla racémica que consiste de igual cantidad de ácido láctico D y ácido láctico L. Lamentablemente, sin embargo, la proporción de la composición del ácido láctico D y del ácido láctico L no puede ser controlada. Por lo tanto, cuando el ácido láctico racémico es utilizado para crear ácido poliláctico se produce un polímero amorfo con un bajo punto de fusión, que a su vez se convierte en un obstáculo para un rango amplio de aplicaciones. Por otro lado, el proceso de fermentación biológica utilizando microorganismos hace posible el producir selectivamente ácido láctico D o ácido láctico L dependiendo de la cepa usada. Por ejemplo, los microorganismos tales como *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Rhizopus*, *Streptococcus*, y *Enterococcus* habitualmente producen ácido láctico L. Los microorganismos tales como *Leuconostoc* y *Lactobacillus vulgaricus* habitualmente producen ácido láctico D. El ácido láctico L es utilizado preferiblemente en las industrias de cosméticos o alimenticias porque el ácido láctico D no es metabolizado en el cuerpo. El ácido láctico L puede ser utilizado para la preparación de ácido poliláctico. Al hacer eso, el ácido poliláctico es transformado en una forma de cristal que tiene un punto de fusión de 180° C. También, las propiedades físicas del ácido poliláctico pueden ser controladas ajustando el contenido de ácido láctico D para la polimerización. En general, el ácido láctico es aplicable en sustitución de varios tipos de plásticos.

- 45 [0004] Como se ha descrito anteriormente, el ácido láctico tiene un gran potencial para ser un material de sustitución respetuoso con el medio ambiente en un amplio rango de aplicaciones industriales. Por lo tanto, es muy importante desarrollar un método para producir ácido láctico a través de la fermentación biológica que es más económica que la síntesis química tradicional. Con este fin, hay una necesidad urgente de desarrollar una cepa productora de ácido láctico y un método rentable para producir ácido láctico.

- 50 [Descripción de las Figuras]

[0005] Lo anterior y otros objetos, características y otras ventajas de la presente invención serán más claramente entendidas de la siguiente descripción detallada tomada en conjunto con las figuras acompañantes, en las que:

- La Figura 1 es un gráfico que muestra la relación entre el tiempo de fermentación y la concentración de células, concentración de glucosa y concentración de ácido láctico la fermentación de ácido láctico utilizando *Lactobacillus paracasei* CJLA0310 en un medio de cultivo que consiste de 180 g/L de glucosa, 15 g/L de extracto de levadura, y 10 g/L de peptona; y

La Figura 2 es un gráfico que muestra la relación entre el tiempo de fermentación y la concentración de células, concentración de glucosa y concentración de ácido láctico en la fermentación de ácido láctico utilizando *Lactobacillus paracasei* CJLA0310 en un medio de cultivo que consiste de 180 g/L de glucosa, 7 g/L de peptona, y 15 g/L de CSP (Polvo Escarpado de Maíz).

[Divulgación]

[Problema técnico]

[0006] Por lo tanto, la presente invención ha sido hecha en vista de los problemas anteriores, y es un objeto de la presente invención proporcionar un microorganismo productor de ácido láctico para producir ácido láctico industrialmente útil más efectivamente a través de la fermentación biológica. Más específicamente, la presente invención está dirigida a desarrollar un método para producir bacterias de ácido láctico industrialmente útiles con alta concentración y alto rendimiento, el método implica la separación de bacterias de ácido láctico caracterizadas por una excelente eficiencia de crecimiento y capacidad de producción de ácido láctico.

[0007] Es otro objeto de la presente invención proporcionar una cepa productora de ácido láctico que ofrezca un alto rendimiento de ácido láctico durante el proceso de fermentación de ácido láctico biológico, alta concentración de ácido láctico en un caldo de fermentación al final del proceso de fermentación, bajo tiempo de fermentación, alta productividad y alta eficiencia económica.

[Solución técnica]

[0008] De acuerdo con un aspecto de la presente invención, lo anterior y otros objetos pueden ser conseguidos suministrando un método para producir ácido láctico e gran pureza utilizando bacterias de ácido láctico nuevas separadas e identificadas como *Lactobacillus paracasei* CJLA0310 KCCM-10542 que presentan una capacidad de producción de ácido láctico excelente.

[0009] De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método de fermentación para producir ácido láctico con alta concentración y alto rendimiento utilizando la cepa *Lactobacillus paracasei* CJLA0310 que es separada e identificada del Kimchi, y un método para ajustar una relación de producción de ácido láctico L y ácido láctico D bajo las condiciones de cultivo adecuadas utilizando la cepa.

[0010] De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se sugiere la posibilidad de reducir el coste de producción del ácido láctico utilizando polvo escarpado de maíz de bajo precio en sustitución del extracto de levadura en un medio, que es conocido como un factor clave para aumentar el costo de fabricación.

[Efectos ventajosos]

[0011] La *Lactobacillus paracasei* CJLA0310 es una cepa productora de ácido láctico separada del Kimchi, y bajo condiciones de cultivo adecuadas puede producir un ácido láctico L ópticamente puro con alta concentración y alto rendimiento. La presente invención proporciona la producción biológica del ácido láctico L que es uno de los ácidos orgánicos útiles industrialmente. Debido a que la producción biológica hace posible producir en masa ácido láctico con alto rendimiento y alta productividad con respecto a los carbohidratos, la presente invención puede ser muy ventajosamente utilizada para las industrias de comida y el medio ambiente.

[Modo de llevar a cabo la invención]

Ejemplo 1: Separación e identificación de las bacterias productoras de ácido láctico

[0012] Los presentes inventores separaron el fluido de Kimchi que fue recolectado de una unidad de eliminación de desechos de Kimchi en la fábrica Icheon 1 Kimchi de CJ CORP. localizada en Icheon-si, Gyeonggi-do, Corea. El fluido fue después diluido con una solución salina fisiológica (8,5 g/L NaCl) y untada uniformemente sobre los medios MRS (fabricados por Difco Co.). Tras dos días de cultivo a 37° C, las colonias fueron separadas y se asumió que las colonias particularmente amarillentas entre ellas eran bacterias de ácido láctico. Las 12 colonias más grandes de las colonias amarillentas fueron separadas y cultivadas, respectivamente, en los medios líquidos MRS a 37° C durante dos días, para obtener una cepa con las más altas tasa de crecimiento de células y capacidad de producción de ácido láctico. Parte de la secuencia de base (800 bp) del ADN 16S de la cepa fue comparada con la base de datos de secuencias de base de ADN de 11 tipos de cepas estándar de *Lactobacillus*. Como se muestra en la Tabla 1 a continuación, se observó que la secuencia de base de ADN de la cepa separada manifestó un 89% de similitud a la de la cepa estándar de *Lactobacillus*. Especialmente, la cepa resultó ser un microorganismo *Lactobacillus* nuevo que mostraba un 100% de similitud con el *Lactobacillus paracasei* subsp. *Paracasei* y el *Lactobacillus paracasei* subsp. *Tolerans*. Por lo tanto, la cepa fue llamada *Lactobacillus paracasei* CJLA0310. La cepa fue depositada en el KCCM (Korean Culture Center of Microorganisms) el 4 de Diciembre del 2003 y se le dio el número KCCM-10542.

[Tabla 1]

Secuencia de base de ADNr 16s similitud entre la CJLA0310 y la cepa estándar de <i>Lactobacillus</i>	
Nombre de la cepa	Similitud (%)
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>Paracasei</i> JCM 8130T	100,00
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i> JCM 1171T	100,00
<i>Lactobacillus zeae</i> ATCC 15820T	98,63
<i>Lactobacillus casei</i> JCM 1134T	98,62
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> JCM 1136T	97,87

Ejemplo 2: Características de fermentación del ácido láctico del microorganismo nuevo (180 g/L de glucosa + 15 g/L de extracto de levadura +10 g/L de peptona)

[0013] Para cultivar el nuevo ácido láctico CJLA0310, se sembraron primero 600 ml de inóculo durante 18 horas en un medio consistente de 180 g/L de glucosa, 15 g/L de extracto de levadura, y 10 g/L de peptona. Después el inóculo fue sembrado en un fermentador (5 L) que contenía 2,4 L del medio de fermentación que consistía de 180 g/L de glucosa, 15 g/L de extracto de levadura, y 10 g/L de peptona. El inóculo fue cultivado durante 50 horas a un PH de 6,0, 200 rpm, y 37° C. Como se muestra en la Figura 2, tras 50 horas del proceso de cultivo se consumieron 180 g de glucosa, el medio de cultivo celular (O.D.₆₀₀) = 24, y se produjeron finalmente 181 g/L de ácido láctico. Por lo tanto, el rendimiento de ácido láctico = 99,5%, y el volumen de productividad media por hora = 3,85 g/L/hr.

Ejemplo 3: Características de fermentación del ácido láctico del microorganismo nuevo (160 g/L de glucosa + 15 g/L de extracto de levadura +15 g/L de peptona)

[0014] Para cultivar el nuevo ácido láctico CJLA0310, se sembraron primero 600 ml de inóculo durante 18 horas en el medio de cultivo del ejemplo 2. Después, el inóculo fue sembrado en un fermentador (5 L) que contenía 2,4 L del medio de fermentación que consistía de 160 g/L de glucosa, 15 g/L de extracto de levadura, y 15 g/L de peptona. El inóculo fue cultivado durante 50 horas a un pH de 6,0, 200 rpm, y 33, 35, 37, 39 y 41° C, respectivamente. Como se muestra en la Tabla 2, la proporción de fermentación del ácido láctico D y el ácido láctico L puede ser ajustada de acuerdo a las temperaturas de fermentación.

[Tabla 2]

Relación entre la proporción de producción de ácido láctico D y ácido láctico L y las temperaturas de fermentación					
Temperatura de Fermentación (° C)	33	35	37	39	41
Relación de fermentación (5)	4,0:	3,5:	3,3:	3,1:	0,7:
(ácido láctico D : ácido láctico L)	96,0	96,5	96,7	96,9	99,3

Ejemplo 4: Características de fermentación del ácido láctico del microorganismo nuevo (180 g/L de glucosa + 7 g/L de peptona +15 g/L de CSP)

[0015] Para cultivar el nuevo ácido láctico CJLA0310, se sembraron primero 600 ml de inóculo durante 18 horas en el medio de cultivo del ejemplo 2. Después el inóculo fue sembrado en un fermentador (5 L) que contenía 2,4 L del medio de fermentación que consistía de 180 g/L de glucosa, 7 g/L de peptona, y 15 g/L de CSP (Polvo Escarpado de Maíz). El inóculo fue cultivado durante 70 horas a un PH de 6,0, 200 rpm, y 37° C. Como se muestra en la Figura 2, tras 65 horas del proceso de cultivo se consumieron 180 g de glucosa, el medio de cultivo celular (O.D.₆₀₀) = 24, y se produjeron finalmente 179,1 g/L de ácido láctico. Por lo tanto, el rendimiento de ácido láctico = 99,5%, y el volumen de productividad media por hora = 2,76 g/L/hr.

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Una cepa de *Lactobacillus paracasei* CJLA0310 KCCM-10542, **caracterizada porque**, el rendimiento de ácido láctico en un medio que contiene 180 g/L de glucosa, 15 g/L de extracto de levadura y 10 g/L de peptona o 180 g/L de glucosa, 7 g/L de peptona y 15 g/L de polvo escurpado de maíz, tras el consumo total de glucosa a 37° C y un pH=6 es al menos del 99,5%.
- 2.** El uso de una cepa de *Lactobacillus paracasei* CJLA0310 KCCM-10542 para producir ácido láctico.

Fig. 1

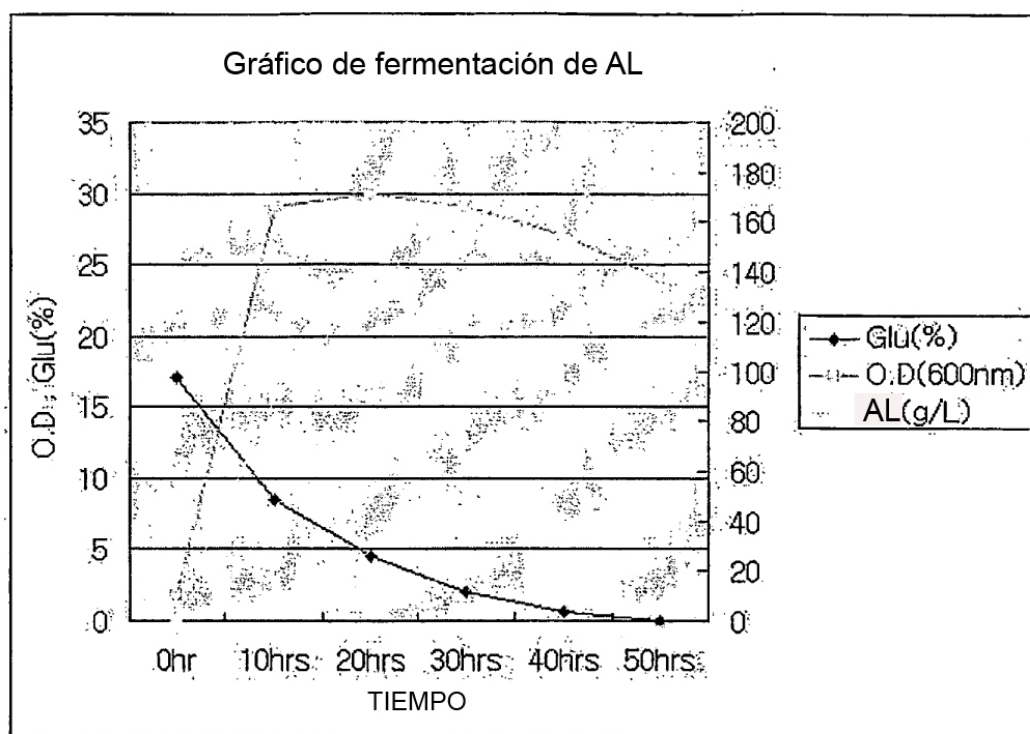


Fig. 2

