(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 357 423**

(51) Int. Cl.:
C12M 3/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **02797640 .6**
(96) Fecha de presentación : **29.08.2002**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1451290**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **01.09.2004**

(54) Título: **Unidad y procedimiento para realizar fermentación a alta densidad celular.**

(30) Prioridad: **31.08.2001 US 316837 P**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
26.04.2011

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
26.04.2011

(73) Titular/es: **BAYER SCHERING PHARMA AKTIENGESELLSCHAFT**
Müllerstrasse 178
13353 Berlin, DE

(72) Inventor/es: **Henzler, Hans-Jürgen;**
Kauling, Jörg;
Schmitt, Franz;
Beckers, Erhard;
Bödeker, Berthold;
Von Hugo, Hasso;
Konstantinov, Konstantin;
Naveh, David y
Steiner, Ulrich

(74) Agente: **Carpintero López, Mario**

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).

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. Pº de la Castellana, 75 – 28071 Madrid

DESCRIPCIÓN

La presente invención se refiere a un procedimiento continuo para cultivar líneas celulares suspendidas, animales o vegetales, con el objetivo de producir eficazmente productos biológicos. La invención se refiere también a unidades y aparatos en los que puede realizarse el procedimiento de acuerdo con la invención para cultivar líneas celulares suspendidas, animales o vegetales.

Los cultivos celulares son altamente importantes para la producción de sustancias biológicamente activas y productos farmacéuticamente activos. En particular, el cultivo de las células, que se usan frecuentemente y se suspenden libremente en el medio nutriente, es difícil y complicado puesto que, en contraste con los microorganismos o células adherentes, son muy sensibles a las tensiones mecánicas y a un suministro insuficiente de sustrato. Por esta razón, las unidades y aparatos de acuerdo con la invención, y los procedimientos técnicos usados, son de crucial importancia para un procedimiento de producción eficaz.

En la mayoría de los procedimientos técnicos para cultivar líneas suspendidas, animales o vegetales, se usan procedimientos discontinuos. Dichos procedimientos tienen la desventaja de que el recuento celular, las concentraciones del medio nutriente, y los metabolitos cambian continuamente a lo largo del ciclo discontinuo de días o semanas, y que las células muertas se acumulan en la última fase de la fermentación y los productos formados experimentan degradación enzimática o espontánea. De esta manera, los procedimientos de fermentación continua son recomendables, particularmente para la producción de compuestos activos inestables.

Los procedimientos continuos son económicos y competitivos si pueden conseguirse altas densidades celulares en el fermentador y, correspondientemente, se obtiene una alta productividad. Esto requiere

(1) un suministro suficiente de oxígeno en el fermentador para cubrir la alta demanda de oxígeno de las células a altas densidades,

(2) un sistema de retención celular que permita una retención eficaz de las células en el sistema de reactor,

(3) un funcionamiento a largo plazo más fiable con respecto a las condiciones de operación estacionarias (concentraciones de célula, sustrato, metabolito y producto) y esterilidad a largo plazo de todo el sistema de reactor y

(4) un procedimiento que pueda manejarse de forma robusta, sencilla y fácil.

El procedimiento debería tener en cuenta también la alta sensibilidad de las células hacia la tensión mecánica y el suministro insuficiente de sustrato, y la inestabilidad de los productos.

La técnica anterior describe un gran número de aparatos, unidades y procedimientos para cultivar líneas celulares. Las siguientes variantes de aparatos y unidades ya se conocen:

1. Fermentadores

El suministro de oxígeno sin burbujas a través de membranas porosas o de difusión es el procedimiento de suministro de oxígeno seleccionado frecuentemente para los fermentadores de cultivo celular, puesto que la formación, ascensión y explosión de burbujas en la superficie del líquido somete a las células a altos grados de tensión. Los agitadores recomendados para este fin son agitadores relativamente pequeños, de alta velocidad, de transporte axial, que se disponen centralmente en estatores de membrana (por ejemplo, Fenge, Fraune, Maier, 1992. BioTec, 4: 52-54). Dicho diseño de reactor es desventajoso, debido tanto a los agitadores de alta velocidad, de transporte axial, que provocan grados muy altos de tensión como debido al hecho de que tiene lugar una velocidad relativamente baja y, en consecuencia, una baja velocidad de transporte de oxígeno, sobre las membranas localizadas entre la pared del recipiente y el agitador.

El diseño de reactor más adecuado es aquel en el que el transporte de oxígeno se intensifica mediante grandes agitadores, dispuestos a una ligera distancia desde y sobre toda la altura de la membranas, aunque debido a los tabiques deflectores usados en este diseño de reactor, únicamente puede usarse un estator de membrana relativamente pequeño y una superficie de transferencia de masa correspondientemente pequeña.

Puesto que cuando el procedimiento se aumenta de escala la proporción entre el área superficial de la membrana y el volumen del reactor cambia de una manera inversamente proporcional al diámetro del reactor, el procedimiento de suministro de oxígeno mencionado anteriormente sólo es adecuado para reactores pequeños o para menores densidades celulares.

También, el suministro de oxígeno mediante una aireación con burbujas grandes y la dispersión de las burbujas mediante agitación limitan la densidad celular y la viabilidad del cultivo celular, debido al gran grado de tensión mecánica implicada.

2. Retención celular

En el pasado, se han propuesto numerosos sistemas de retención celular diferentes, para procedimientos de fermentación continuos, que están dispuestos apropiadamente fuera del fermentador, para permitir una manipulación flexible.

Para minimizar el daño a las células que ocurre cuando se usan aparatos externos, en particular como resultado del suministro insuficiente de oxígeno a las células y la retirada insuficiente de CO_2 fuera del fermentador, los sistemas de retención celular con pequeños volúmenes de trabajo y un tiempo de residencia correspondientemente corto de las células en el sistema de retención celular son particularmente deseables.

Además de los filtros de membrana y las unidades de filtración de flujo cruzado con membranas estacionarias y móviles, se han usado centrífugas y aparatos de sedimentación especiales.

Cuando la retención celular tiene lugar mediante filtros de membrana, se observan, sin embargo, efectos de ensuciamiento que hacen imposible el funcionamiento a largo plazo, robusto y de bajo mantenimiento de los mismos. Una reducción en el ensuciamiento puede obtenerse mediante una alta velocidad de flujo en las membranas. Puesto que las altas velocidades en las bombas, tuberías y canales de las unidades de membrana, sin embargo, producen un aumento de la tensión, la necesidad de altas velocidades se rechaza por el requisito de un tratamiento de baja cizalla de las células.

Para la retirada de las células mediante centrifugación se han desarrollado centrífugas especiales que tienen la desventaja de someter las células a una tensión mecánica aumentada, puesto que se usan aceleraciones de más de doscientas veces la aceleración gravitatoria para su retirada. Además, las centrífugas no funcionan de forma fiable durante varias semanas o meses sin mantenimiento, y provocan también un aumento de los costes operativos.

Un procedimiento adicional de retirada de células de los sobrenadantes de cultivo celular es el uso de unidades de sedimentación gravitatoria. Las unidades de sedimentación gravitatoria usadas predominantemente en el cultivo celular son tanques de sedimentación y sistemas de canales inclinados. Comparados con los recipientes de sedimentación sencillos, los sistemas de canales inclinados tienen la ventaja de un volumen considerablemente menor.

Los sistemas descritos hasta ahora (J. Stevens, u.a.: Preprint Esact-Meeting 1993 Würzburg; K.J. Thompson, J.S. Wilson: Preprint Esact-Meeting 1993 Würzburg; J.A. Searles, u.a. Biotechnol. Prog. 1994,10, 188-206; WO 94/26384) son sistemas contracorriente con áreas de sedimentación muy pequeñas (A_{th}=z l b_1 cos α < 0,2 m^2; z: número de placas; b_1: anchura; L: longitud de los canales; A: inclinación respecto a la horizontal) y, por lo tanto, no pueden usarse para producción a escala. El documento US 5 817 505 describe el uso de un separador de sedimentación para separar células de hibridoma del medio que contiene anticuerpos.

El aumento de escala es un problema en los sistemas de canales inclinados en contracorriente, puesto que el volumen de concentrado requerido y las cámaras de recogida de fase clarificada del separador de sedimentación, V_{SF}, aumenta superproporcionalmente a medida que aumenta el volumen del fermentador V ($V_{SF} \propto V^{1,5}$ a una velocidad de perfusión constante) y aumenta aún más con el aumento de la velocidad de perfusión q/V ($V_{SF} \propto (qN)^{2,15}$ a un volumen de fermentador constante). La geometría de la mayoría de los sistemas de canales inclinados propuestos para el cultivo de células, sin embargo, evita su uso a gran escala, debido a la geometría no ventajosa (secciones de flujo de entrada y flujo de salida y longitud del canal) y los grandes volúmenes de trabajo que se obtendrán como resultado. Las cámaras de recogida de fase concentrada y clarificada, y los canales de corriente de flujo de entrada y de salida incorporados en la misma están diseñados de forma desventajosa en las variantes propuestas. Las longitudes del sistema de canales inclinados usado, que están en el intervalo de 100 a 300 mm, son comparativamente cortas. La longitud de canal propuesta más frecuentemente es de sólo 100 mm. Las características de las variantes propuestas, sin embargo, no resultan negativas para aquellos clientes que se sabe que han usado dichos sistemas, puesto que sólo se realizaron ensayos a una escala pequeña (con un volumen de fermentador de 1 a 25 l).

Para la fermentación a alta densidad celular, usando concentraciones celulares de más de 1,5 x 10^7 células vivas por ml de volumen del reactor, sería necesario un separador de sedimentación con un volumen de 70 a 550 o de 50 a 500 l, para un volumen de fermentador de 100 a 200 l (incluso cuando se usan células BHK, de sedimentación relativamente rápida) si se usa el diseño de sedimentador convencional. La densidad celular deseada de 1,5 x 10^7 células vivas por ml de volumen del reactor no podría obtenerse en dichas unidades durante largos periodos de tiempo, puesto que la velocidad de crecimiento preferido de $\mu \approx 0,4/d$ podría no mantenerse debido al largo tiempo de residencia en el separador de sedimentación y el suministro insuficiente de oxígeno correspondiente.

Aunque el boletín Bayer AG (1992, Chemie Technik, 21(3), 118) contiene una referencia a sistemas de canales inclinados largos, de 0,2 a 2,5 m, el presente documento describe sistemas de distribución de líquido y cámaras de recogida de concentrado, que no satisfacen los requisitos relacionados con un pequeño volumen de trabajo. Debido al hecho de que, en las unidades desveladas, el medio se inyecta en un dispositivo de tipo copa (para reducir la turbulencia en la cámara de recepción (32)) el propio volumen de la cámara de recepción (32) debe ser

relativamente grande. De hecho, es imposible construir dichas cámaras de recepción con un dispositivo de tipo copa y que tengan una geometría puramente cónica o piramidal. Para poner el dispositivo de copa en la cámara de recepción, la cámara de recepción debe tener una sección cilíndrica, además de una sección cónica o piramidal, puesto que el volumen de la cámara de recepción aumenta. En el ejemplo mencionado anteriormente los volúmenes de trabajo del separador de sedimentación serían de V_S = 50 a 100 l, que es mucho mayor que el volumen de los separadores de la invención.

2.1 Enfriamiento

Para reducir la actividad metabólica y los depósitos celulares en el separador de sedimentación, se ha propuesto el enfriamiento del caldo de cultivo celular en el separador de sedimentación. Debido a la formación de gradientes de temperatura (y gradientes de densidad correspondientes) en el interior del separador de sedimentación, esta propuesta fundamentalmente correcta, sin embargo, conduce a corrientes de convección. Éstas, a su vez, tienen un efecto negativo sobre la eficacia de la separación celular. Esto es particularmente crucial cuando se usan separadores con una proporción relativamente baja de área superficial del separador a volumen del separador, puesto que en dichas unidades sólo pueden obtenerse capacidades de producción volumétrica relativamente pequeñas por volumen de separador.

2.2 Vibración

Para reducir el tiempo de residencia de las células en separadores de sedimentación, se ha propuesto una vibración no definida del sistema de canales inclinados (Bayer AG, 1992, Chemie-Technik, 21(3): 118; Searles, y col. 1994. Biotechnology Progress, 10: 188-206).

3. Un fermentador de inoculación

Para el funcionamiento eficaz del procedimiento de fermentación, se requiere una densidad celular inicial específica en los fermentadores, puesto que las densidades celulares de partida insuficientes conducen a un crecimiento retardado de las células, debido a la ausencia de alomonas. (En el caso de células animales, la densidad celular de partida debería ser de aproximadamente 10^6 células por ml). De esta manera, dependiendo del tamaño del fermentador de producción, son necesarios diversos pre-fermentadores. Para el cultivo de las células normalmente se emplean fermentadores que funcionan de forma discontinua, con los que pueden obtenerse densidades celulares de 5 x 10^6 ó 8 x 10^6 células por ml, debido a su modo de operación más sencillo. Esto significa que, por ejemplo, para inocular un fermentador de producción de 200 l partiendo de una conserva celular, sería necesaria una expansión del tren de siembra convencional, con muchos matraces T y 60 frascos rotatorios.

4. Bombas de baja-cizalla y tuberías

El funcionamiento del procedimiento requiere bombas y tuberías que interconecten el tanque de almacenamiento, el fermentador, el separador de sedimentación externo y el recipiente de recogida. En la bibliografía conocida no se dan detalles de la selección y diseño de las bombas y tuberías. Este aspecto, sin embargo, es muy importante para el cultivo a largo plazo en condiciones estériles a altas concentraciones celulares y vitalidad. Debe prestarse atención también a la disposición correcta de las bombas en la unidad en su conjunto. La disposición de las bombas en la corriente de reciclado del concentrado, que conduce al fermentador, como se describe en la patente WO94/26384, es desventajosa, puesto que como resultado, la suspensión celular concentrada (es decir, un gran número de células) se expone a la tensión mecánica muy alta en las bombas.

Basándose en las consideraciones anteriores, surge el problema técnico de desarrollar unidades, aparatos y un procedimiento eficaz para fermentar células sensibles a cizalla con las que los productos biológicos pueden producirse de forma económica y con alta calidad.

Este problema se resuelve de acuerdo con la invención mediante una unidad de fermentación que consiste en al menos en un tanque de almacenamiento que contiene el medio nutriente, bombas y tuberías, un fermentador de producción, al menos dos cambiadores de calor de flujo directo y un separador de sedimentación de retención celular, que está equipado opcionalmente con un vibrador (5). Un procedimiento de fermentación continuo, con altas velocidades de perfusión, también es ventajoso para resolver el problema técnico en cuestión.

Breve descripción de la invención

El despliegue del procedimiento consiste en numerosos aparatos, y al menos un tanque de almacenamiento (1) que contiene el medio nutriente, bombas y tuberías (7, 8), el fermentador de producción (2), que está perfundido continuamente, al menos intermitentemente, al menos dos cambiadores de calor de flujo directo (3) y un separador de sedimentación de retención de celular (4), que está equipado opcionalmente con un vibrador, estando diseñados los componentes de la unidad de tal manera que el cultivo a largo plazo, en el que las células cultivadas se someten a bajos grados de tensión mecánica, puede realizarse durante tiempos de procedimiento de más de un mes. Con ayuda

de las unidades de acuerdo con la invención, se obtienen cultivos que tienen estabilidad a largo plazo de más de 3-5 meses, a densidades celulares de más de 1,5 x 10^7 células vivas por ml de volumen del reactor, y una viabilidad mayor del 80%, preferentemente del 90%. En el presente contexto, la viabilidad se define como el porcentaje relativo del número total de células en el cultivo que consiste en células vivas.

Las densidades celulares, viabilidades y tiempos de cultivo, sin embargo, pueden ser menores/más cortos, dependiendo del organismo y tipo de procedimiento de fermentación usado.

En el procedimiento de acuerdo con la invención, también es posible usar un fermentador de inoculación (9) diseñado de forma especial, y que funciona de forma discontinua y/o continua, cuyo volumen de carga máximo es menor del 6% del volumen del fermentador de producción y que, independientemente de ello, permite un aumento de 50 a 150 veces en el recuento celular.

Con la ayuda de la presente invención se obtiene una alta productividad del procedimiento, a pesar del uso de células sensibles y productos susceptibles de degradación.

Descripción detallada de la invención

La invención se refiere a una unidad de fermentación que difiere de la técnica anterior en variantes ventajosas en diversos puntos de la unidad. Aunque las variantes ventajosas pueden presentar también sus efectos ventajosos durante el aislamiento, una variante preferida es una en la que interaccionan varias o todas la características ventajosas de la unidad de acuerdo con la invención. De esta manera, el aumento de la capacidad de transferencia de oxígeno del fermentador principal puede ser particularmente eficaz, por ejemplo, puesto que se establece una mayor densidad celular en el cultivo, debido al reciclado celular más eficaz en el separador de sedimentación. Se obtienen efectos sinérgicos similares para aumentar la productividad global del procedimiento de fermentación, también mediante la interacción de los otros componentes de la unidad de acuerdo con la invención.

La invención se refiere también a un procedimiento ventajoso para realizar procedimientos de fermentación a alta densidad celular en unidades de acuerdo con la invención. Los procedimientos de acuerdo con la invención hacen posible usar eficazmente el efecto positivo de las variantes de la unidad de fermentación de acuerdo con la invención.

A continuación, se describen las variantes ventajosas de la unidad de fermentación:

1. El fermentador de producción

Debido a su diseño óptimo con respecto a la agitación, el fermentador de producción (2) se distingue por una alta velocidad de transferencia de masa en una interfaz de fases gas/líquida, y una tensión de cizalla mínima.

Se han desarrollado tres tipos de fermentador variables que producen los efectos mencionados anteriormente.

En el caso de un fermentador tipo A (Figura 3) el suministro de oxígeno tiene lugar a través de membranas de difusión. Las membranas de tubo de silicio empleadas, que tienen espesores de pared pequeños, se enrollan axialmente sobre un estator tubular, que rodea el agitador concéntricamente (14). Es ventajoso que el fermentador y el estator tubular se diseñen de una manera esbelta, puesto que esto posibilita que puedan obtenerse superficies de transferencia de masa más grandes, específicas para el volumen (A/V [m^{-1}]). El agitador es un agitador (13) de anclaje multi-paleta, de área grande, que está sólo a una pequeña distancia, preferentemente de 5 a 15 mm alejado de los tubos de silicona, y cuyas paletas agitadoras se extienden por toda la longitud del estator tubular. Incluso a bajas velocidades de rotación del agitador, y potencias del agitador de menos de 10 a 20 vatios por m^3 de volumen del fermentador, este tipo de diseño produce una ligera vibración de los tubos de silicona, de manera que tiene lugar una intensificación adicional de la transferencia de masa y la limpieza simultánea de las membranas durante el funcionamiento.

Para la suspensión satisfactoria de las células, los agitadores empleados se modifican de manera que, de acuerdo con la invención, pueden extenderse a la región cercana a la base del recipiente. Esto se hace posible ahusando las paletas agitadoras en la región cercana a la base (13a).

El fermentador de acuerdo con el tipo A no contiene ningún tabique deflector. Como resultado, el estator tubular puede ser muy grande y son posibles áreas superficiales de transferencia de masa específicas de A/V > 10/D (A: área de transferencia de masa; V: volumen del fermentador; D: diámetro del recipiente). De esta manera, pueden usarse agitadores particularmente grandes con d/D > 0,6 (d: diámetro externo del agitador), que producen un grado de cizalla particularmente bajo.

El movimiento periférico que aún predomina, en contraste con los sistemas que contienen tabiques deflectores, sorprendentemente produce una intensificación adicional de la transferencia de masa, y una aireación adicional con burbujas. Las burbujas de gas experimentan un movimiento tangencial que, a un tamaño de burbuja dado, produce un mayor contenido de gas en el fermentador y, de esta manera, una mayor interfaz de las fases.

Además del estator tubular de silicona, puede incorporarse adicionalmente un anillo de aireación (17), en la base del fermentador, para la aireación adicional de burbujas. Esto permite un transporte adicional de oxígeno, y la intensificación posiblemente requerida de la retirada de CO_2.

Cuando se usan oxígeno puro y presiones en exceso en los tubos de silicona, pueden obtenerse densidades celulares muy altas de hasta 2 x 10^7 células vivas por ml con el fermentador tipo A.

En el caso del fermentador tipo B (Figura 4) el suministro de oxígeno tiene lugar únicamente a través de una aireación de burbujas finas con oxígeno.

La aireación de burbujas finas se obtiene mediante cuerpos sinterizados especiales, placas de filtro, membranas cerámicas o placas perforadas por láser (20) que tienen poros u orificios de un tamaño muy pequeño de d_L< 15 μm. Debido a las bajas velocidades superficiales del gas de v < 0,5 m/h que pueden usarse, se forman burbujas de gas muy pequeñas, que representan sólo una ligera tendencia a coalescer durante la agitación moderada, con agitadores de baja velocidad. La demanda de oxígeno de la fermentación a alta densidad celular puede obtenerse, por lo tanto, con menos de 1/10 de las velocidades superficiales de gas que son necesarias para la aireación de burbujas grandes a través de orificios perforados mecánicamente (d_L > 0,2 mm), de manera que el crecimiento de las células no se ve afectado negativamente por el procedimiento de aireación.

Además, de acuerdo con la invención, se usan grandes agitadores (18) de paleta multi-etapa, de baja velocidad, que tienen una proporción de diámetro externo del agitador a diámetro interno del recipiente de d/D > 0,5, preferentemente d/D > 0,6, para la agitación, puesto que se ha descubierto, sorprendentemente, que los agitadores de alta velocidad, y particularmente los de alta velocidad y transporte axial, provocan la coalescencia de las burbujas de gas. Estos agitadores grandes producen una distribución de baja cizalla, sin coalescencia, de las burbujas de gas finas. Al mismo tiempo, los agitadores que se extienden cerca de la base y los tabiques deflectores a una distancia desde la base del recipiente, producen la suspensión y distribución uniforme de la biomasa, incluso a potencias del agitador muy bajas de P/V < 5 W/m^3, debido al movimiento tangencial producido en la base.

Los tabiques deflectores (19) no se incorporan de una manera radial sino inclinada, como resultado de lo cual se obtiene una eficacia de transferencia de masa un 40% mayor (flujo másico por potencia del agitador específica para el volumen) y una reducción adicional correspondiente en la tensión de las células.

Puesto que los tabiques deflectores (19) no están localizados en la pared y no están sólo a una distancia desde la base, sino que tampoco se extienden hasta la superficie del líquido y, por lo tanto, están cubiertos en la parte superior por el líquido, los depósitos pueden evitarse sustancialmente. Esto crea un pre-requisito importante para la limpieza *in situ* (LES: “limpieza en el sitio”).

En el caso del fermentador tipo C (Figura 5), el suministro de oxígeno tiene lugar (como en el caso B) a través de una aireación de oxígeno de burbujas finas. En contraste con B, se usa un reactor sin tabiques deflectores, con un agitador (21) de paletas multi-etapa, dispuesto excéntricamente.

La disposición excéntrica del agitador (21) intensifica la mezcla axial pero, sin embargo, no suprime completamente el componente de flujo de periférico, como en el caso cuando se utilizan tabiques deflectores y, en particular, tabiques deflectores de pared. Como ya se ha mencionado anteriormente, el movimiento periférico que aún predomina, sorprendentemente, intensifica la transferencia de masa en la interfaz de fases gas/líquida. Las burbujas de gas experimentan un movimiento tangencial que, a un tamaño de burbuja dado, produce un mayor contenido de gas y una interfaz de fases correspondientemente mayor.

La disposición excéntrica del agitador de acuerdo con la invención evita sustancialmente los depósitos celulares, y crea un pre-requisito ideal para la limpieza LES de los fermentadores.

De acuerdo con la invención, cuando se usan densidades celulares de oxígeno puro de hasta 5 x 10^7 células vivas por ml, pueden conseguirse con fermentadores tipo B y C a viabilidades de > 90%.

2. El fermentador de inoculación

Para simplificar el procedimiento de fermentación, la cantidad de semillas para el fermentador de producción se produce en un pre-cultivo de una sola etapa. Éste se inocula directamente usando un tubo de cultivo madre, sin ninguna etapa de cultivo adicional. Para obtener el aumento de 50 a 150 veces requerido en el recuento celular en el fermentador de inoculación (9) se requieren, sin embargo, un tipo especial de geometría del fermentador y un tipo especial de pre-cultivo. En particular, es necesario que el cultivo se inocule a un volumen de trabajo pequeño, que se aumenta de tamaño durante etapa de pre-cultivo mediante la adición del medio nutriente.

La geometría del fermentador especial era necesaria, puesto que se requiere una concentración celular de más de 10^5 células por ml (preferentemente > 5 x 10^5 a 10^6 células por ml) para el cultivo eficaz de células animales. Si

la concentración celular es menor, los metabolitos y alomonas requeridos para el crecimiento rápido están presentes en una concentración demasiado baja para las altas velocidades de crecimiento a obtener.

De acuerdo con la invención, el fermentador (Figura 6) tiene una sección transversal que está ahusada en una dirección descendente. Una variante especial es de forma cilíndrica, tanto en la sección inferior (27a) como en la sección superior (27b), teniendo la sección inferior un diámetro más pequeño. La sección inferior, de esta manera, contiene sólo aproximadamente 1/6 del volumen total. Un accesorio de transición con forma especial conecta la sección inferior a la superior del recipiente.

Otros reactores de acuerdo con la invención tienen una forma cónica, que está ahusada en la dirección descendente.

Para la agitación se usa un sistema de agitación multi-etapa, que consiste en varios agitadores (23, 23a) de paletas con área grande, y tabiques deflectores sumergidos cerca de los agitadores. La aireación tiene lugar a través de micro-rociadores, dispuestos cerca de la base del recipiente. De acuerdo con la invención, el sistema agitador está diseñado de manera que la potencia introducida en cada sección transversal del reactor sea suficiente para la distribución uniforme de las microburbujas y el movimiento de las células. Para este fin, de acuerdo con la sección transversal variable del reactor, se usan agitadores de paleta que tienen un diámetro variable y una altura de paleta y distancias variables entre sí.

Como una alternativa al sistema de reactor que usa tabiques deflectores, se usa un sistema de reactor sin tabiques deflectores, y con un sistema agitador (23) dispuesto excéntricamente.

El cultivo en el pre-fermentador (9) puede hacerse funcionar, sucesivamente, como un procedimiento de perfusión discontinuo, de alimentación discontinua y continuo, con o sin retención celular. El funcionamiento continuo del pre-cultivo es particularmente ventajoso, puesto que se obtienen densidades celulares 3-4 veces mayores que en los procedimientos de fermentación discontinuos, y la inoculación del material para los fermentadores de producción puede proporcionarse durante un mayor periodo de tiempo, de manera que puede tener lugar el rápido inicio de cualquier procedimiento de producción posterior.

Durante el funcionamiento continuo del procedimiento de pre-cultivo, se usa un procedimiento técnico análogo al del cultivo de producción. El despliegue del procedimiento consiste, de nuevo, en numerosos aparatos y al menos un tanque de almacenamiento que contiene el medio nutriente, bombas y tuberías, el fermentador de inoculación (9) que se perfunde después continuamente, cambiadores de calor de flujo directo y un sistema de retención celular, con o sin un vibrador, estando diseñados todos los componentes del procedimiento de manera que puede conseguirse un cultivo de baja cizalla con densidades celulares mayores de 10^7 células vivas por ml de volumen del reactor, y una viabilidad mayor del 90%. 3. Separador de sedimentación

Los separadores de sedimentación externos (4), desarrollados para el procedimiento, se caracterizan por un volumen mínimo para un área superficial eficaz dada del separador, como resultado de lo cual los tiempos de residencia de las células fuera del fermentador y el suministro insuficiente de oxígeno correspondiente pueden reducirse a un mínimo.

Los separadores de sedimentación usados en las unidades de fermentación de acuerdo con la invención contienen tubos o canales que tienen una sección transversal rectangular, y están dispuestos en paralelo. Los aparatos de acuerdo con la invención tienen, preferentemente, diámetros de tubo o alturas de canal de 10 mm o menor, una longitud de aproximadamente 0,2 a 2,5 m o de aproximadamente de 0,2 a 1,5 m y un ángulo de inclinación hacia la horizontal de α = 40-65º.

En el caso del separador con canales paralelos, que tiene una sección transversal rectangular, el aparato consiste en un módulo rectangular (29), estable frente a presión, que se atornilla al recipiente de retorno de concentrado (32, 44), dispuesto por debajo del mismo, y a una placa de revestimiento, mediante bridas soldadas. El módulo rectangular (29) contiene surcos que determinan la altura del canal y están dispuestos opuestos entre sí, en dos lados, a espaciados constantes, y en los que las placas se insertan de acuerdo con la invención, que forman el límite de los canales individuales. La sección transversal del módulo es preferentemente un rectángulo cuya proporción de altura a anchura (a/b_1) corresponde al seno del ángulo de inclinación del módulo (Figura 15). Esto permite que el área superficial y el volumen del recipiente de retorno de concentrado por debajo del módulo, sean tan pequeños como sea posible.

El módulo se estampa desde un bloque sólido de material, o se sueldan juntos sin costuras, a partir de secciones con forma de U prefabricadas, o a partir de cuatro placas.

Los diversos elementos estructurales se atornillan juntos, de tal manera que la esterilidad a largo plazo puede garantizarse con ayuda de juntas tóricas.

Los separadores de sedimentación usados en las unidades de acuerdo con la invención pueden desmontarse, de tal manera que puedan limpiarse y mantenerse fácilmente. En lo que respecta al separador con canales paralelos, que tiene una sección transversal rectangular, esto se aplica también a las placas (30) que forman los canales. Pueden retirarse después de que la placa de revestimiento se haya desatornillado y, si fuera necesario, pueden limpiarse externamente.

De acuerdo con la invención, en separadores de sedimentación grandes, el módulo se monta de una manera rotatoria (4a) en el centro de masas del aparato en su conjunto, de manera que las placas puedan retirarse fácilmente en una posición horizontal y reinsertarse en los surcos del módulo.

Para reducir el tiempo de residencia de las células fuera del fermentador, las superficies orientadas hacia arriba del separador de sedimentación se fabrican con un alto grado de suavidad superficial y, preferentemente, con una rugosidad superficial de Ra < 0,25 μm, como se define en DIN 4768, que es equivalente a ISO 3274 y ASMER B46.1-1995. Como una alternativa, se ha demostrado que las superficies revestidas hidrófobamente, y las superficies con un efecto de flor de loto, son adecuadas.

Se entiende que un efecto de flor de loto es el efecto repelente de manchas de ciertas superficies, debido a la combinación adecuada de una estructura superficial bien definida (rugosidad) y las propiedades del material en cuestión, tal como se observa, por ejemplo, en ciertas plantas, tal como por ejemplo en flores de loto. Una estructura superficial con pequeños bultos microscópicos, fabricados de un material adecuado, se considera por ejemplo responsable del efecto de flor de loto. Un material adecuado empleado es frecuentemente un material hidrófobo.

3.1 Separador de sedimentación contracorriente

Los separadores de sedimentación contracorriente (Figuras 8 a 12) consisten en tres partes: el módulo que contiene los canales (31), el recipiente de retorno de concentrado (32) y la placa de revestimiento (29).

La suspensión que sale del fermentador (2) se introduce por debajo de los canales inclinados en un recipiente (32), cónico o piramidal, y la fase clarificada se retira por encima de los canales (38).

La salida de reciclado para el concentrado se incorpora centralmente (36) en la cámara de recepción en su punto más bajo, de manera que los aglomerados celulares que se deslicen fuera de la placas en la dirección descendente puedan recogerse en la cámara de recepción, y reciclarse en el fermentador. Puesto que en la cámara de recepción (32) del separador de sedimentación en contracorriente tiene lugar tanto el flujo de entrada de la suspensión celular a clarificar como el retorno de los aglomerados celulares separados formados en los canales, y puesto que de acuerdo con la invención el volumen de este recipiente debería minimizarse, las características de flujo del recipiente y las tuberías de flujo de entrada se han diseñado de una manera favorable. En particular, cuando se aumenta de escala para el uso de aparatos más grandes, debe evitarse cualquier promoción adicional de las fluctuaciones en la velocidad (por ejemplo, tras el comienzo de la turbulencia) debidas a la corriente de flujo de entrada. Sólo de esta manera es posible asegurar que la parte principal de los aglomerados separados en la cámara de recepción no se resuspendan y reintroduzcan en los canales (31). Los aparatos diseñados de forma desfavorable que presentan este fenómeno conducen a una reducción en la viabilidad celular por debajo del 80%.

Basándose en consideraciones fundamentales con respecto a principios de diseño de dinámica de fluido, que parecen ser apropiados para el recipiente de recepción, se seleccionaron y optimizaron adicionalmente mediante cálculos de CFD (dinámica de fluidos computacional) y ensayos experimentales especiales. Los siguientes principios de diseño se desarrollaron en consecuencia, de acuerdo con la invención:

- la disposición simétrica de los canales de flujo de entrada (34) para evitar el movimiento potencial cíclico en la cámara de recepción;
- el uso de grandes secciones transversales para el flujo de entrada, para asegurar que las velocidades de la corriente de flujo de entrada son menores de 0,1 m/s;
- el uso de difusores de flujo de entrada con un pequeño ángulo del vértice, que producen una reducción en la velocidad con baja turbulencia;
- el uso de difusores cónicos con ángulos semi-cónicos de menos de 4º o, como alternativa, de menos de 6º, y en los que se usan difusores planos a un diferencial longitudinal del área de la sección transversal dividido por la periferia (1/P dA/ds) de menos de 0,1 (P: periferia [cm]; A: área [cm^2]; s: coordenada de longitud [cm]).
- el uso de dos corrientes de flujo de entrada radiales, preferentemente tangenciales.

En el caso de una variante de la corriente de flujo de entrada radial (Figura 8) con dos corrientes de flujo de entrada (35), directamente opuestas, que producen sólo un punto de estancamiento en el flujo en el centro de la

cámara de recepción, los puntos de entrada de las corrientes de flujo de entrada se disponen a una distancia clara desde los canales y la salida de reciclado del concentrado. Las distancias son preferentemente mayores de 15 veces la altura del canal o, preferentemente, 10 veces mayores que el diámetro de la salida de reciclado de concentrado. El flujo de entrada tiene lugar a una altura geométrica por encima de la base de la cámara de recepción, que es mayor que la mitad y menor de 0,8 de la altura total de la cámara de recepción.

Las variantes de la corriente de flujo de entrada en las que las corrientes de flujo de entrada están dispuestas tangencialmente, se distinguen mediante la disposición de corrientes de flujo de entrada en direcciones idénticas (Figura 9; Figura 11) o en direcciones opuestas (Figura 10; Figura 12).

En el caso de una corriente de flujo de entrada tangencial, y una cámara de recepción cónica, el flujo de entrada puede tener lugar preferentemente en un canal anular (40 en la Figura 9) dispuesto fuera del recipiente.

3.2 Separador de sedimentación de flujo cruzado

En el caso de separadores de sedimentación de flujo cruzado, los canales se diseñan de acuerdo con la invención como canales rectangulares. Los aparatos consisten en un módulo que comprende los canales, la placa de revestimiento y el recipiente de retorno de concentrado. En el módulo, la corriente de flujo de entrada desde el fermentador se dispone en un lado los canales, y la salida de la fase clarificada en el lado opuesto. Dentro de las cámaras de flujo de entrada y de flujo de salida pueden construirse placas (49) para la mejora de la distribución del líquido. Las placas pueden ser placas planas o conformadas. Las placas se disponen, preferentemente, en proximidad cercana y, preferentemente, perpendiculares a los canales de flujo de entrada y de flujo de salida. Para asegurar una distribución uniforme del líquido en todos los canales, el flujo de entrada tiene lugar a través de difusores de flujo de entrada circulares o planos, en una cámara aguas arriba o aguas abajo de los canales. De acuerdo con la invención, estas regiones de flujo están diseñadas usando ensayos de dinámica de fluidos especiales, de tal manera que se obtenga un flujo laminar, no separado, a velocidades de menos de 0,1 m/s y la distribución uniforme tiene lugar sobre los canales dispuestos en paralelo.

Además del flujo de entrada del medio desde el canal de flujo de entrada, puede ser ventajoso suministrar una cierta cantidad de caldo de fermentación directamente a la cámara de recepción (44), cónica o piramidal. Este procedimiento reduce el tiempo de retención de las células en la cámara de recepción (44), cónica o piramidal.

Por debajo de los canales inclinados está localizado un recipiente cónico o piramidal, en el que la salida de reciclado de concentrado se incorpora centralmente en el punto más bajo.

Los separadores de flujo cruzado tienen las siguientes propiedades ventajosas:

- La separación y el reciclado de las células no está impedida, como en el caso de los sistemas en contracorriente, por el flujo contracorriente.
- El flujo co-direccional del concentrado descendente promueve el deslizamiento hacia abajo de las células en las placas. Este es particularmente el caso cuando la proporción de retorno de concentrado a la corriente de fase clarificada q_R/q es mayor de 2.
- Dada una sección transversal idéntica del canal, el recipiente de recogida de concentrado puede ser menor que en el caso del separador contracorriente, puesto que de acuerdo con el diseño del separador de flujo cruzado, el flujo de entrada no tiene lugar en el recipiente de recogida de concentrado.
- La cámara de recepción aguas arriba de los canales de separación, y la cámara de flujo de salida aguas abajo del mismo, pueden tener dimensiones tales que sus volúmenes, cuando se aumenta de escala el procedimiento, no aumenta superproporcionalmente a medida que aumenta el área del separador, que en comparación con el separador contracorriente representa una ventaja crucial del separador de flujo cruzado.
- En este tipo de separador, la longitud del canal puede ser menor que en el separador de sedimentación contracorriente. Cuanto menor sea la longitud del canal, la no existencia de flujo contracorriente y la corriente de retorno que promueve el deslizamiento hacia abajo de las células reduce el tiempo de residencia de las células en el separador.

El separador de flujo de cruzado, por lo tanto, se usa preferentemente para densidades celulares extremadamente altas.

4. Vibración

Para acelerar el reciclado de las células y evitar el ensuciamiento de los canales, pueden usarse vibradores que funcionan neumáticamente o eléctricamente. Se fijan preferentemente en la parte superior o en la brida del recipiente de retorno de concentrado.

La intensidad, amplitud y frecuencia de vibración se adaptan a las condiciones operativas y de cultivo, y del sistema de retención celular en cuestión. La intensidad de vibración es preferentemente de 0,1 a 0,3 g, la amplitud de 0,1 a 1 mm y la frecuencia de 20 a 50 Hz.

5. Uso de un ciclón, un sistema de separación ultrasónico y un segundo aparato de sedimentación

Para la separación y reducción preliminar de la masa celular a separar en el separador de sedimentación, puede ser recomendable disponer un ciclón o un sistema de separación ultrasónico aguas arriba del separador de sedimentación. Dicho ciclón puede separar hasta el 50% de la masa celular y más, a una velocidad de flujo de entrada menor, es decir, a un menor grado de tensión en las células. Puede obtenerse un efecto similar con los sistemas de separación ultrasónicos disponibles en el mercado (por ejemplo, Biosep de Applikon, Schiedam, Países Bajos), que permiten la separación parcial a velocidades de perfusión técnicamente ventajosas.

Debido a la menor concentración celular, se obtienen un reciclado de células mejorado y mayores velocidades de perfusión en los procedimientos de proporción celular posteriores, en el separador de sedimentación. De esta manera, es posible hacer funcionar al fermentador a mayores densidades celulares y aumentar la productividad del procedimiento.

La separación de aglomerados celulares más grandes mediante un aparato de sedimentación más pequeño aguas arriba o, preferentemente, aguas abajo del separador de sedimentación, tiene un efecto análogamente positivo. Puesto que los aglomerados grandes encierran un mayor porcentaje en número de células muertas, debido al suministro insuficiente de sustrato (difusión limitada), estas células muertas se retiran en un mayor grado que las células vivas, reduciéndose el recuento de células totales y aumentado la vitalidad.

6. Bombas, tuberías y cambiadores de calor

Se requieren tres bombas para el funcionamiento continuo del procedimiento de fermentación. La primera bomba es responsable de la introducción del sustrato en el fermentador, la segunda bomba transporta la suspensión celular del fermentador al separador de sedimentación, y la tercera bomba del separador al recipiente de recogida. Tienen que usarse bombas de baja cizalla para las dos bombas de transporte de la suspensión celular y, en particular, para la bomba 2, de manera que no tenga lugar una reducción de la vitalidad celular. De acuerdo con la invención, se usan bombas de desplazamiento positivo, de baja velocidad, que transportan la suspensión con un bajo grado de pulsación. Las bombas de manguera, con grandes tubos de bombeo, y otras bombas de desplazamiento positivo sin sellado que provocan una tensión en las partículas de menos de 0,01 N/m^2 o menos de 0,004 N/m^2 han demostrado ser adecuadas para el funcionamiento estéril a largo plazo.

Los cambiadores de calor en espiral, que permiten un calentamiento eficaz a tiempos de residencia bajos, se usan para enfriar la suspensión celular a temperaturas menores que la temperatura del fermentador, antes de que ésta entre en el separador, y para calentarla a la temperatura de fermentador durante el reciclado al fermentador.

Las tuberías y accesorios de conexión a los aparatos están diseñados de manera que sólo velocidades de flujo bajas, por encima del límite de deposición de las células, predominan en las tuberías, los codos en las tuberías se reducen al mínimo y sólo tiene lugar un ensanchamiento gradual de la sección transversal. Se usan preferentemente accesorios de codo que tienen proporciones de curvatura de radio a diámetro de tubería de > 2. El ensanchamiento de la sección transversal comprende difusores con ángulos de semi-cono de hasta 6º, preferentemente hasta 4º. La reducción en la sección transversal y la aceleración correspondiente del flujo debe limitarse, de manera que las fuerzas de inercia que ocurren como resultado de la aceleración del flujo permanezcan pequeñas.

La invención se refiere a una unidad para realizar una fermentación continua, a alta densidad celular, que contiene un fermentador de pre-cultivo (9), un tanque de almacenamiento de sustrato (1), un fermentador de producción (2), un separador de sedimentación (4) y un recipiente de recogida (6), en el que el separador de sedimentación tiene un área del separador basada en el volumen del separador de $A_{th}/V_s > 30$ m^2/m^3 o, más preferentemente, de $A_{th}/V_s > 70$ m^2/m^3. Aún más preferentemente, áreas superficiales del separador basadas en el volumen del separador de $A_{th}/V_S = 50$ a 100 m^2/m^3. Preferentemente, el separador de sedimentación es un separador de sedimentación en contracorriente. En una realización preferida, el separador tiene un área superficial absoluta de A_{th} = 0,5 m^2 a 10 m^2 y aún tiene la alta A_{th}/V_s como se ha descrito anteriormente.

La invención se refiere también a una unidad para realizar la fermentación continua, a alta densidad celular, que contiene un fermentador de pre-cultivo (9), un tanque de almacenamiento de sustrato (1), un fermentador de producción (2), un separador de sedimentación (4) y un recipiente de recogida (6) en el que el separador de sedimentación tiene una cámara de recepción cónica (32) o piramidal (43), y el flujo de entrada hacia la cámara de recepción del separador de sedimentación tiene lugar a través de al menos dos conductos dispuestas radialmente (35), tangencialmente en una dirección idéntica (39, 42) o tangencialmente en direcciones opuestas (41, 43), estando los conductos distribuidos de una manera regular sobre la sección transversal.

La invención se refiere también a la unidad mencionada anteriormente, en la que el flujo de entrada en el separador de sedimentación tiene lugar a través de los conductos dispuestos tangencialmente, en una dirección idéntica, en un canal anular (40) dispuesto fuera de la cámara de recepción.

Además, la invención se refiere a unidades para fermentación a alta densidad celular, en las que el flujo de entrada al separador de sedimentación tiene lugar a través de difusores circulares (35), que tienen un ángulo de semi-cono de como máximo 6º, más preferentemente 4º, o a través de difusores planos (39) que tienen un diferencial longitudinal del área de la sección transversal relacionada con la periferia de 0,1 o menos, a velocidades de como máximo 0,1 m/s.

Además, la invención se refiere a una unidad para realizar una fermentación continua, a alta densidad celular, que contiene al menos un aparato de sedimentación, en el que la entrada para el flujo de entrada desde el fermentador (45, 48) y la salida para la fase clarificada (46) se disponen en cualquier lado de los canales de sedimentación, y la cámara de recogida de concentrado (44) consiste en un recipiente piramidal o cónico, dispuesto simétricamente por debajo de los canales de sedimentación, y en el que el flujo cruzado se genera en los canales verticalmente respecto a la biomasa que se desliza hacia abajo por los canales.

Además, la invención se refiere a las unidades anteriores, en las que la proporción de anchura (b_1) del módulo y la longitud (L) de los canales del separador de sedimentación en corriente cruzada, es cercana a 1.

Además, la invención se refiere a las unidades anteriores, en las que el flujo de entrada (35) en la cámara de recepción del separador de sedimentación tiene lugar a una altura geométrica por encima de la base de la cámara de recepción, que es más de la mitad de la altura total de la cámara de recepción y menos de 0,8 de la altura total de la cámara de recepción.

Una variante de la invención contiene un separador de sedimentación, que consiste en un módulo rectangular (29) en el que los canales individuales (31) están separados espacialmente entre sí mediante placas (30) y dichas placas se guían y se mantienen en surcos en el módulo y, si fuera necesario, pueden ensamblarse o desensamblarse.

La invención se refiere también a las unidades anteriores, en las que los canales de sedimentación rectangulares o tubos de sedimentación del separador de sedimentación son de 50 cm de longitud o mayor, y las alturas de canal correspondientes son menores de o iguales a 10 mm.

Las alturas de canal más preferidas son aquellas entre 4 y 6 mm. Se ha descubierto que las alturas de canal entre 4 y 6 mm representan las alturas óptimas con respecto a las características de sedimentación y volumen de sedimentación. Las alturas de canal menores conducen a características de sedimentación más desfavorables, mientras que las alturas de canal mayores conducen a un volumen desfavorable alto del sedimentador. Estas alturas de canal muy pequeñas son diferentes de aquellas conocidas de los sedimentadores del estado de la técnica, por ejemplo, sedimentadores tales como los usados para el reciclado de lodos en las plantas de tratamiento de aguas residuales.

La invención se refiere también a las unidades anteriores, en las que los canales de sedimentación, o los tubos de sedimentación rectangulares del separador de sedimentación son de 50 cm de longitud, para el separador contracorriente, y de 20 cm de longitud para el separador de corriente cruzada, o mayores, y las alturas del canal correspondiente son menores de o iguales a 10 mm.

Además, la invención se refiere a la unidad anterior, en la que las placas o tubos paralelos del separador de sedimentación se disponen dentro de un módulo rectangular, cuya proporción de altura de la sección transversal (a) a anchura de la sección transversal (b_1) corresponde aproximadamente al seno del ángulo entre la horizontal y el ángulo de inclinación del módulo (Figura 15), en su estado ensamblado.

Además, la invención se refiere a una unidad como se ha descrito anteriormente, en la que placas o tubos paralelos del separador de sedimentación tienen una rugosidad superficial de menos de Ra = 0,25 μm en sus superficies orientadas hacia arriba, o estas superficies no están revestidas hidrófobamente, o tienen un acabado superficial con un efecto de flor de loto.

La invención se refiere también a una unidad en la que las placas o tubos paralelos del separador de sedimentación pueden someterse a vibraciones de una frecuencia y amplitud específicas.

Además, la invención se refiere a una unidad para realizar una fermentación continua, a alta densidad celular, que contiene un fermentador de pre-cultivo (9), un tanque de almacenamiento de sustrato (1), un fermentador de producción (2), un separador de sedimentación (4) y un recipiente de recogida (6), en el que el separador de sedimentación se hace funcionar de acuerdo con el principio de flujo cruzado (Figuras 13, 14).

La invención se refiere también a unidades para realizar procedimientos continuos de fermentación, a alta

densidad celular, en los que el fermentador de pre-cultivo (9) tiene una sección transversal que está ahusada en una dirección descendente, el agitador del fermentador de pre-cultivo (23) está suspendido de una manera excéntrica y la aireación del pre-cultivo se realiza mediante una unidad de aireación de micro-rociado (25).

La invención se refiere también a unidades para realizar procedimientos continuos de fermentación, a alta densidad celular, en los que un agitador de anclaje (13), de mayor área, y un sistema de aireación sin burbujas (14), enrollado axialmente, se usan en el fermentador de producción. Una unidad de aireación (17) puede incorporarse adicionalmente en estas unidades, y las paletas agitadoras del agitador de anclaje pueden ahusarse en la región cercana a la base (13a).

En lugar del agitador de anclaje, pueden usarse también agitadores de compuerta. Los agitadores de anclaje o compuerta tienen un diámetro preferido mayor que la mitad del diámetro del recipiente, más preferentemente el 70% del diámetro del recipiente o 80% del diámetro del recipiente.

La invención se refiere también a unidades para realizar procedimientos continuos de fermentación, a alta densidad celular, en los que un agitador de paletas (18) de área grande y tabiques deflectores (19) que están inclinados en una dirección periférica y están dispuestos a una distancia desde la pared, la base del fermentador y la superficie del líquido y un anillo de aireación para micro-rociado (17) se disponen en el fermentador de producción.

La invención se refiere también, finalmente, a unidades para realizar procedimientos continuos de fermentación, a alta densidad celular, en los que un agitador de paletas (21) de área grande se dispone de una manera excéntrica en el fermentador de producción, así como a unidades en las que un anillo de aireación para micro-rociado (17) se incorpora adicionalmente en el fermentador de producción.

La invención se refiere también a unidades en las que un hidrociclón (11) o un sistema de separación ultrasónico se dispone aguas arriba del separador de sedimentación, y a unidades en las que un separador de aglomerado (12) se dispone aguas abajo de la salida de reciclado del separador de sedimentación (36).

Un separador de aglomerado, en el contexto de la invención, es un dispositivo para retirar aglomerados celulares de un medio líquido, que funciona por ejemplo de acuerdo con el principio de sedimentación. Un separador de aglomerado permite la separación de aglomerados celulares desde una corriente de medio que fluye continuamente.

La invención se refiere también a unidades en las que un cambiador de calor de flujo directo (3) está dispuesto, en cada caso, entre la salida del tanque de fermentación y la entrada del separador de sedimentación, y entre la salida de concentrado del separador de sedimentación (36) y la entrada de reciclado del tanque de fermentación.

La invención, sin embargo, se refiere también a un procedimiento para realizar procedimientos continuos de fermentación, a alta densidad celular, en los que se usa una unidad de acuerdo con la invención. Este procedimiento puede realizarse usando un pre-cultivo de una sola etapa, en el que el pre-cultivo se realiza, al menos intermitentemente, como un procedimiento de alimentación discontinua, en el que el volumen de pre-cultivo aumenta a al menos 5 veces el volumen inicial, debido a la alimentación discontinua. El pre-cultivo puede realizarse también intermitentemente, como un procedimiento continuo con el reciclado celular.

En el procedimiento de acuerdo con la invención, también es posible realizar un pre-cultivo como un procedimiento continuo con el reciclado celular, al mismo tiempo que el cultivo de producción, para proporcionar la siembra a lo largo de un periodo de tiempo relativamente largo, para el siguiente cultivo o cultivos principales realizados en paralelo.

(Breve descripción de las figuras)

A continuación, se describen ejemplos de trabajo de la invención con más detalle, con ayuda de dibujos esquemáticos.

Figura 1: El despliegue del procedimiento con un tanque de almacenamiento de sustrato (1), bombas (8), tuberías (7), el fermentador de producción (2), los cambiadores de calor de flujo directo (3), un sistema de retención celular (4) con un vibrador (5) y un recipiente de recogida (6), un fermentador de pre-cultivo (9) y un tubo de cultivo madre (10).

Figura 2: Parte del despliegue del procedimiento, que comprende bombas, cambiadores de calor de flujo directo, un ciclón o un sistema de separación ultrasónica y un sistema de retención celular montado en el centro de masas, y que tiene un vibrador y un sistema de sedimentación dispuestos aguas abajo.

Figura 3: Un fermentador agitado de tipo A, que comprende un sistema de anclaje y una jaula de aireación, para la aireación de los tubos de silicona.

Figura 4: Un fermentador agitado de tipo B, que comprende agitadores de paletas de área grande, tabiques deflectores sumergidos e inclinados cerca de los agitadores y micro-rociadores dispuestos cerca de la base.

Figura 5: Un fermentador agitado de tipo C, que comprende agitadores de paleta de área grande, que están dispuestos de una manera excéntrica, y micro-rociadores dispuestos cerca de la base.

Figura 6: Un fermentador de inoculación.

Figura 7: Un separador de sedimentación contracorriente, con tubos dispuestos en paralelo y flujo de entrada radial en la cámara de recepción cónica.

Figura 8: Un separador de sedimentación contracorriente, con canales dispuestos en paralelo y flujo de entrada radial en la cámara de recepción cónica.

Figura 9: Un separador de sedimentación contracorriente, con canales dispuestos en paralelo y flujo de entrada tangencial, en una dirección idéntica, en un canal anular (40) dispuesto en el lado externo de la cámara de recepción cónica.

Figura 10: Un separador de sedimentación contracorriente, con canales dispuestos en paralelo y flujo de entrada tangencial, en direcciones opuestas, a una cámara de recepción cónica.

Figura 11: Un separador de sedimentación contracorriente, con canales dispuestos en paralelo y dos corrientes de flujo de entrada tangenciales diferentes, dirigidas de forma opuesta, a una cámara de recepción cónica.

Figura 12: Un separador de sedimentación contracorriente, con canales dispuestos en paralelo y dos corrientes de flujo de entrada tangenciales diferentes, dirigidas de forma opuesta a una cámara recepción piramidal.

Figura 13: Un separador de sedimentación de flujo cruzado, con canales dispuestos en paralelo, y una entrada (45) para el flujo de entrada desde el fermentador, y una salida de la fase clarificada (46) dispuesta a cada lado de los canales, y una cámara de recepción (44) piramidal, por debajo de los canales.

Figura 14: Un separador de sedimentación de flujo cruzado, con canales dispuestos en paralelo, y una entrada (48) para el flujo de entrada desde el fermentador, y una salida de fase clarificada (46) dispuestas a cada lado de los canales, y una cámara de recepción (44), piramidal o cónica, por debajo de los canales. Las placas (49) están dispuestas en proximidad cercana al canal de flujo de entrada (48) y el canal de flujo de salida (46), que se han montado, preferentemente, perpendiculares a los canales de flujo de entrada y de flujo de salida.

Figura 15: Geometría del separador de sedimentación.

Ejemplos

Ejemplo 1

Cultivo continuo de células de hibridoma con suministro de oxígeno basado en membrana, y rociado adicional, y retención de células contracorriente usando un fermentador de 40 litros

El despliegue del procedimiento, de acuerdo con las Figuras 1 y 2, consiste en un tanque de almacenamiento (1) que contiene el medio nutriente, con 1 g/l de albúmina de suero humana (HSA), tres bombas con velocidades de bombeo de 3-30 l/h, de las cuales al menos aquellas que entran en contacto con la suspensión celular son bombas tubulares y tuberías de baja cizalla (7), teniendo el fermentador (2) perfundido continuamente un volumen de trabajo de 40 litros, un separador de sedimentación (4) contracorriente por gravedad, de acuerdo con la Figura 8, con un área superficial de separación teórica de A_{th} = 0,56 m^2 (A_{th} = z b_1 L cos α; z: número de canales, b_1: anchura del canal, L: longitud del canal, α: inclinación de los canales respecto a la vertical) a una longitud de canal de L = 630 mm y las dimensiones adicionales z = 16; b_1 = 111 mm; α = 60º, y un vibrador (5), que funciona neumáticamente, que somete el separador a vibración, con aceleraciones de b = 0,1 g.

El separador contracorriente es altamente eficaz debido a la alta área de sedimentación específica de A_{th}/V_s = 63 m^2/m^3, basada en el volumen del separador.

El fermentador es un fermentador agitado de acuerdo con la Figura 3, que tiene un agitador de anclaje de baja velocidad (13) y un estator tubular de silicona (14) que tiene un área superficial específica de 65 m^2/m^3. Las cuatro paletas del agitador de anclaje (13) están a una distancia de 8 mm de los tubos de silicona (16), y se extienden por toda la longitud del estator (14). Además de la membrana de silicona, un rociador anular (17) de acuerdo con la Figura 3, con orificios de 0,5 mm, se dispone cerca del fondo. Si la concentración celular supera 2 x 10^7 células/ml, se aplica un rociado de oxígeno adicional hasta velocidades superficiales de de gas de hasta 2 m/h.

Después de una fase inicial de aproximadamente 12 días, pueden alcanzarse concentraciones celulares de 30 a 50 x10^7 células viables/ml. Esta condición de estado casi estacionario del sistema fermentador-sedimentador celular se obtiene a velocidades de perfusión de 6,9 volúmenes de fermentador por día. El separador celular usado, a esta velocidad de perfusión, tiene un grado medio de retención para células vivas de R = 94,5% y un grado medio de retención para células muertas de R_d = 92%, y sólo es capaz de garantizar dicha concentración celular en el funcionamiento a largo plazo durante un largo periodo con viabilidades celulares (proporción del número de células viables a número de células totales) entre el 75 y el 85%, y concentraciones de anticuerpo de 100 mg/l. Después de 70 días el cultivo se detuvo.

Ejemplo 2

Cultivo continuo de células BHK, con suministro de oxígeno basado en membrana, y un sistema de retención celular contracorriente, usando un fermentador de 100 l.

El despliegue del procedimiento de acuerdo con las Figuras 1 y 2 consiste en un tanque de almacenamiento (1) que contiene el medio nutriente, con 1 g/l de HSA, tres bombas con velocidades de bombeo de 20 a 100 l/h, de las cuales al menos aquellas que entran en contacto con la suspensión celular son bombas tubulares y tuberías de baja cizalla (7), con diámetros mayores de 10 mm, teniendo el fermentador (2) perfundido continuamente un volumen de llenado de 100 l, cambiadores de calor de flujo directo (3) con áreas superficiales de intercambio de calor específicas mayores de 300 m^2/m^3, un separador de sedimentación contracorriente por gravedad (4) con un área superficial de separación teórica de A_{th} = 1,4 m^2, a una longitud de canal de L = 960 mm y las dimensiones adicionales z = 20; b_1 = 148 mm; α = 60º (véase la Figura 8) y un vibrador (5) que funciona neumáticamente, que somete al separador a vibración con aceleraciones de b = 0,2 g. El separador contracorriente es altamente eficaz, debido al área de sedimentación altamente específica de A_{th}/V_S = 77 m^2/m^3. El caldo de fermentación, con una temperatura de 37ºC, que procede del fermentador, se enfría para entrar en el separador celular, mediante el cambiador de calor, a 20ºC y se calienta de nuevo a 37ºC antes de entrar en el fermentador.

El fermentador es un fermentador agitado de acuerdo con la Figura 3, que se agita mediante un agitador de anclaje de baja velocidad (13) y un estator (14) de tubos de silicona, que tiene un área superficial de transferencia de masa específica de 33 m^2/m^3. Las cuatro paletas del agitador de anclaje (13) están a una distancia de 10 mm desde los tubos de silicona (16) y se extienden sobre toda la longitud del estator (14). A una velocidad de rotación del agitador de 20 rpm, que corresponde a una potencia de entrada de 15 W/m^3, se obtiene una entrada de oxígeno que es suficiente para el cultivo de 1,5 a 2 x 10^7 células BHK vivas/ml cuando se usa oxígeno puro y una presión interna del tubo de 2 bar.

Para el suministro de nutrientes para 1,5 a 2 x 10^7 células BHK vivas/ml, es necesaria una velocidad de perfusión de 10 volúmenes de fermentador/d. El separador celular usado tiene un grado medio de retención para células vivas de R = 97% y a una velocidad de crecimiento observada de μ = 0,4/d es justo capaz de garantizar dicha concentración celular en una operación a largo plazo, durante un periodo de 3 meses, con una viabilidad celular mayor de Vi = 90%.

Esta alta viabilidad celular del cultivo podría obtenerse mediante la menor temperatura dentro del separador celular. Las condiciones de cultivo en estado estacionario se obtienen después de aproximadamente 10 días.

Ejemplo 3

Cultivo continuo de células CHO con micro-rociado, y una retención celular contracorriente, en un fermentador de 200 l.

El despliegue del procedimiento está de acuerdo con la Figura 1 y la Figura 2, y consiste en un tanque de almacenamiento (1), que contiene el nutriente con un medio de 1 g/l de pluronic, tres bombas (8), con capacidades de transporte de 20 a 100 l/h, de las cuales al menos aquellas que entran en contacto con la suspensión celular son bombas de desplazamiento (8) y tuberías (7) de baja cizalla, con diámetros mayores de 15 mm, teniendo el fermentador (2) perfundido continuamente un volumen de llenado de 200 l, un cambiador de calor de flujo directo (3) con un área superficial de intercambio de calor específica mayor de 300 m^2/m^3, un separador de sedimentación contracorriente por gravead, de acuerdo con la Figura 14, con un área superficial de separación teórica de A_{th} = 2,4 m^2 a una longitud de canal de 960 mm, y las dimensiones adicionales z = 26; b_1 = 194 mm; α = 60º de acuerdo con la Figura 11 y un vibrador accionado eléctricamente, que somete al separador a vibración con una aceleración de 0,2 g.

El separador contracorriente es altamente eficaz debido a la alta área de sedimentación específica A_{th}/V_s= 84 m^2/m^3, basada en el volumen del separador.

El fermentador es un fermentador agitado, de acuerdo con la Figura 4, que se agita mediante un impulsor de paletas multi-etapa (18), de área grande, con una proporción de diámetro de 0,6, tabiques deflectores inclinados (19) que no tienen contacto con la pared, la superficie del líquido y el fondo. Un rociador anular equipado con ocho placas de metal sinterizado, con un tamaño de poro de 0,5 μm y 10 mm de diámetro, se dispone cerca del fondo. A una

velocidad superficial de oxígeno de sólo 0,2 m/h y una velocidad de rotación del agitador de 25 rpm, que corresponde a una potencia de entrada de 9 W/m^3, se obtiene una entrada de oxígeno que es suficiente para el cultivo de 4 x 10^7 células BHK vivas/ml.

Para el suministro de nutrientes para 4 x 10^7 células CHO vivas/ml, es necesaria una velocidad de perfusión de 4 volúmenes de fermentador/d. Para esta velocidad de perfusión, el separador celular usado tiene un grado medio de retención para células vivas de R = 90%. Con la velocidad de crecimiento celular observada μ = 0,4/d, es posible garantizar dicha concentración celular en una operación a largo plazo durante un periodo de 110 días. La viabilidad de las células permanece por encima del 90% a lo largo de todo el tiempo de cultivo. Las condiciones de estado estacionario con altas densidades celulares se obtienen después de una fase inicial de 15 días.

Ejemplo 4:

Cultivo continuo de células BHK en un medio libre de HSA, con micro-rociado y retención celular contracorriente: fermentador de 200 l.

El despliegue del procedimiento está de acuerdo con las Figuras 1 y 2, y consiste en un tanque de almacenamiento (1), que contiene el nutriente con un medio de 1 g/l pluronic, tres bombas (8) con capacidades de transporte de 75 a 300 l/h, de las cuales al menos aquellas que entran en contacto con la suspensión celular son bombas de desplazamiento (8) y tuberías (7) de baja cizalla, con diámetros mayores de 15 mm, teniendo el fermentador (2) perfundido continuamente un volumen de 200 l, un cambiador de calor de flujo directo (3) con un área superficial de intercambio de calor específica mayor de 200 m^2/m^3, un separador de sedimentación de corriente cruzada por gravedad, de acuerdo con la Figura 14, con un área superficial de separación teórica de A_{th} = 2,8 mm^2 a una longitud de canal de 345 mm y las dimensiones adicionales z = 46; b_1 = 345 mm; α = 60º y un vibrador accionado eléctricamente, que somete al separador a vibración con una aceleración de 0,1 g.

El separador contracorriente de acuerdo con la Figura 14 es altamente eficaz debido a la alta área de sedimentación específica de A_{th}/V_s=75 m^2/m^3, basada en el volumen del separador y la longitud de canal mucho más corta que el sistema contracorriente usado en los Ejemplos 1-3.

El fermentador es un fermentador agitado, de acuerdo con la Figura 3, que se agita mediante un impulsor de paletas multi-etapa (18), de área grande, con una proporción de diámetro de 0,6, tabiques deflectores inclinados (19) que no tienen contacto con la pared, la superficie del líquido y el fondo. Un rociador anular equipado con ocho placas de metal sinterizado, con un tamaño de poro de 0,5 μm y 10 mm de diámetro, se dispone cerca del fondo. A una velocidad de oxígeno superficial de sólo 0,15 m/h y una velocidad de rotación del agitador de 25 rpm, que corresponde a una potencia de entrada de 9 W/m^3, se obtiene una entrada de oxígeno que es suficiente para el cultivo de 3 x 10^7 células BHK vivas/ml.

Para el suministro de nutrientes para 3 x 10^7 células BHK vivas/ml, es necesaria una velocidad de perfusión de 15 volúmenes de fermentador/d. El separador celular usado tiene un grado medio de retención de células vivas de R = 96,8% y, a la velocidad de crecimiento celular observada de μ = 0,5/d, es justo capaz de garantizar dicha concentración celular en una operación a largo plazo durante de un periodo de 100 días. La viabilidad de las células sigue siendo mayor de Vi>95% durante todo el tiempo de cultivo. Las condiciones de cultivo en estado estacionario se obtienen después de una fase inicial de 12 días.

La mayor velocidad de perfusión, la mayor velocidad de crecimiento y el aumento de viabilidad del cultivo, en comparación con los Ejemplos 1 a 3 se consigue mediante el principio de separador de corriente cruzada, que conduce a un tiempo de residencia más corto de las células dentro del separador.

El procedimiento incluye un fermentador de inoculación diseñado especialmente, y que funcione de acuerdo con la Figura 6, cuyo volumen de llenado es menor del 6% del volumen del fermentador de producción, y que permita un aumento de aproximadamente 120 a 150 veces en el recuento celular en dos semanas. La propia inoculación se inicia inoculando con un vial de 50 ml y un volumen de partida de 2 l. Después de 2 días, el volumen se llena hasta 5 l y después de cuatro días hasta 12 l. En los 4 primeros días, el fermentador funciona de modo discontinuo y, después de 5 días, en modo continuo. La concentración celular final de 2 a 2,5 x 10^7 células viables/ml, suficiente para la inoculación del fermentador de 200 l, se obtiene en sólo 12 días. El sistema de retención celular usado para la fermentación continua del fermentador de inoculación se ha diseñado de acuerdo con la Figura 9, con un área superficial de separación teórica de A_{th} = 0,12 m^2 a una longitud de canal de 500 mm.

Ejemplo 5*: Determinación de la tensión de cizalla turbulenta τ.*

Se usan bombas de baja cizalla en el procedimiento. Las bombas se seleccionan mediante un ensayo de bomba especial, en el que las tensiones provocadas por la bomba se ensayan en un modelo experimental usando un sistema de partículas modelo adecuado, de una tensión superficial interfacial conocida σ, en relación con el medio de fermentación acuoso. El diámetro de la partícula en equilibrio d_p, que se auto-estabiliza después de largos periodos de bombeo, da la

tensión de cizalla turbulenta máxima $\tau = \sigma/d_p$ ejercida por la bomba. Si el diámetro de equilibrio del sistema de partículas difiere de el de las células o aglomerados celulares usados durante la fermentación, la tensión provocada por la bomba puede determinarse aplicando las leyes teóricas de turbulencia isotrópica. La tensión de cizalla turbulenta se calcula a partir de las leyes del intervalo de disipación, de acuerdo con las que $\tau_{célula}/\tau_{partícula\ modelo} = d_{células}/d_{partículas\ modelo}$.

REIVINDICACIONES

1. Una unidad para realizar una fermentación continua, a alta densidad celular, que contiene un fermentador de pre-cultivo (9), un tanque de almacenamiento de sustrato (1), un fermentador de producción (2), un separador de sedimentación (4) y un recipiente de recogida (6) **caracterizado porque** el separador de sedimentación tiene un área superficial del separador de $A_{th}/V_s \geq 30$ m^2/m^3, basada en el volumen del separador, y el separador de sedimentación tiene una cámara de recepción (32, 44), cónica o piramidal, y el flujo de entrada en la cámara de recepción del separador de sedimentación tiene lugar a través de al menos dos conductos dispuestos radialmente (35), tangencialmente en una dirección idéntica (39, 34) o tangencialmente en direcciones opuestas (41, 42), estando dispuestos los conductos de una manera regular a lo largo de la sección transversal.

2. Una unidad para realizar una fermentación continua, a alta densidad celular, de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada porque** el separador de sedimentación tiene un área superficial del separador de $A_{th} \geq 0{,}5$ m^2 y, al mismo tiempo, un área superficial específica de $A_{th}/V_s \geq 30$ m^2/m^3 (basada en el volumen del separador) o un área superficial específica de $A_{th}/V \geq 5$ m^2/m^3 (basada en el volumen del fermentador) mientras que la unidad puede funcionar a velocidades de perfusión en el intervalo de 5 a 15 volúmenes de fermentador por día.

3. Una unidad para realizar una fermentación continua, a alta densidad celular, de acuerdo con la reivindicación 1 y 2, **caracterizada porque** el separador de sedimentación tiene un área superficial del separador de $A_{th}/V_s = 50 - 100$ m^2/m^3, basada en el volumen del separador.

4. Una unidad de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el flujo de entrada en el separador de sedimentación (4) tiene lugar a través de los conductos dispuestos tangencialmente, en una dirección idéntica, en un canal anular (40) localizado fuera de la cámara de recepción.

5. Una unidad de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el flujo de entrada (35) en la cámara de recepción del separador de sedimentación (4) tiene lugar a una altura geométrica por encima de la base de la cámara de recepción, que es mayor que la mitad de la altura total de la cámara de recepción, y menor de 0,8 veces, más preferentemente menor de 0,75 veces la altura total de la cámara de recepción.

6. Una unidad de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el separador de sedimentación se hace funcionar de acuerdo con el principio de flujo cruzado.

7. Una unidad de acuerdo con la reivindicación 6, en la que un canal de flujo de entrada adicional transporta el medio de fermentación directamente a la cámara de recepción (33, 44), reduciendo de esta manera el tiempo de retención de las células en dicha cámara de recepción.

8. Una unidad de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones 1 a 7, en la que las placas o tubos paralelos del separador de sedimentación están dispuestos dentro de un módulo rectangular, cuya proporción de altura de la sección transversal a anchura de la sección transversal corresponde aproximadamente al seno del ángulo α entre la horizontal y el ángulo de inclinación del módulo, en su estado ensamblado.

9. Una unidad de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones 1 a 8, en la que el flujo de entrada al separador de sedimentación tiene lugar a través de difusores circulares (35), que tienen un ángulo de semi-cono de como máximo 6º, o a través de difusores planos (39) que tienen un diferencial longitudinal del área de la sección transversal dividido por la periferia (1/P dA/ds) de 0,1 o menor, a velocidades de como máximo 0,1 m/s.

10. Una unidad de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones 1 a 9, en la que dicho separador de sedimentación consiste en un módulo rectangular (29), en el que los canales individuales (31) están separados espacialmente entre sí mediante placas (30), y dichas placas se guían y mantienen en surcos en el módulo, y dichas placas, si fuera necesario, pueden ensamblarse o desensamblarse.

11. Una unidad de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones 1 a 5 y 8 a 10, en la que los canales rectangulares inclinados o tubos del separador de sedimentación son de 50 cm de longitud o mayores, y las alturas del canal correspondiente son menores de o iguales a 10 mm.

12. Una unidad de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones 1 a 5 y 8 a 10, en la que los canales rectangulares inclinados o tubos del separador de sedimentación son de 50 cm de longitud o mayores, y las alturas del canal son de 4 a 6 mm.

13. Una unidad de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones 6 a 7, en la que el separador de sedimentación de corriente cruzada tiene canales rectangulares inclinados que son de 20 cm de longitud o mayores, y los canales son de 10 mm o menos de altura.

14. Una unidad de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones 6 a 7, en la que el separador de

sedimentación de corriente cruzada tiene canales rectangulares inclinados que son de 20 cm de longitud o mayores, y las alturas de los canales son de 4 a 6 mm.

15. Una unidad de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones 1 a 14, en la que las placas o tubos paralelos del separador de sedimentación tienen una rugosidad superficial de menos de Ra = 0,25 μm en sus superficies orientadas hacia arriba, o éstas superficies están revestidas hidrófobamente o tienen un acabado superficial con un efecto de flor de loto.

16. Una unidad de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones 1 a 15, en la que las placas o tubos paralelos del separador de sedimentación pueden someterse a vibraciones de una frecuencia y amplitud específicas.

17. Una unidad de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada porque** el fermentador de pre-cultivo (9) tiene una sección transversal que está ahusada en una dirección descendente, el agitador del fermentador de pre-cultivo (23) está suspendido de una manera excéntrica y la aireación del pre-cultivo se realiza mediante una unidad de aireación de micro-rociado (25).

18. Una unidad de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada porque** se usan un agitador de anclaje (13), de área grande, cerca de la membrana y un sistema de aireación sin burbujas (14), enrollado axialmente, en el fermentador de producción.

19. Una unidad de acuerdo con la reivindicación 18, en la que las paletas agitadoras del agitador de anclaje están ahusadas (13a) en el área cercana a la base (13a, 23a).

20. Una unidad de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones 1 a 19, en la que una unidad de aireación (17) se incorpora adicionalmente para aireación.

21. Una unidad de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada porque** un agitador de paletas (21), de área grande, y tabiques deflectores inclinados (19), que está a una distancia de la pared, de la base del fermentador y de la superficie del líquido, está dispuesto en el fermentador de producción.

22. Una unidad de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada porque** el agitador de paletas (21), de área grande, está dispuesto excéntricamente el fermentador de producción.

23. Una unidad de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones 1 a 22, en la que un anillo de aireación se incorpora adicionalmente en el fermentador de producción, para el micro-rociado (17).

24. Una unidad de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones 1 a 23, en la que un hidrociclón (11), o un sistema de separación ultrasónico, está dispuesto aguas arriba del separador de sedimentación (4).

25. Una unidad de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones 1 a 24, en la que el separador de aglomerado (12) está dispuesto aguas abajo de la salida de reciclado del separador de sedimentación (36, 47).

26. Una unidad de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones 1 a 25, en la que el cambiador de calor de flujo directo (3) está dispuesto, en cada caso, entre la salida del tanque de fermentación y la entrada del separador de sedimentación (34, 45, 48), y entre la salida de concentrado del separador de sedimentación (36, 47) y la entrada de reciclado del tanque de fermentación.

27. Una unidad de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones 1 a 26, en la que se aplican bombas de baja cizalla (8), que conducen a una tensión de cizalla turbulenta de menos de o igual a 0,1 N/m^2.

28. Un procedimiento para realizar una fermentación continua, a alta densidad celular, **caracterizado porque** se usa una unidad de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones 1 a 28.

29. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 28, que usa una etapa de pre-cultivo de una sola fase, **caracterizado porque** el pre-cultivo se realiza, al menos intermitentemente, como un procedimiento de alimentación discontinua, y el volumen de pre-cultivo aumenta, debido a la alimentación discontinua, a al menos 3 a 6 veces su volumen de partida.

30. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 29, en el que el pre-cultivo se realiza, al menos intermitentemente, como un procedimiento continuo con el reciclado celular.

31. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 30, en el que al mismo tiempo que el cultivo de producción, se realiza un pre-cultivo como un procedimiento continuo con el reciclado de las células.

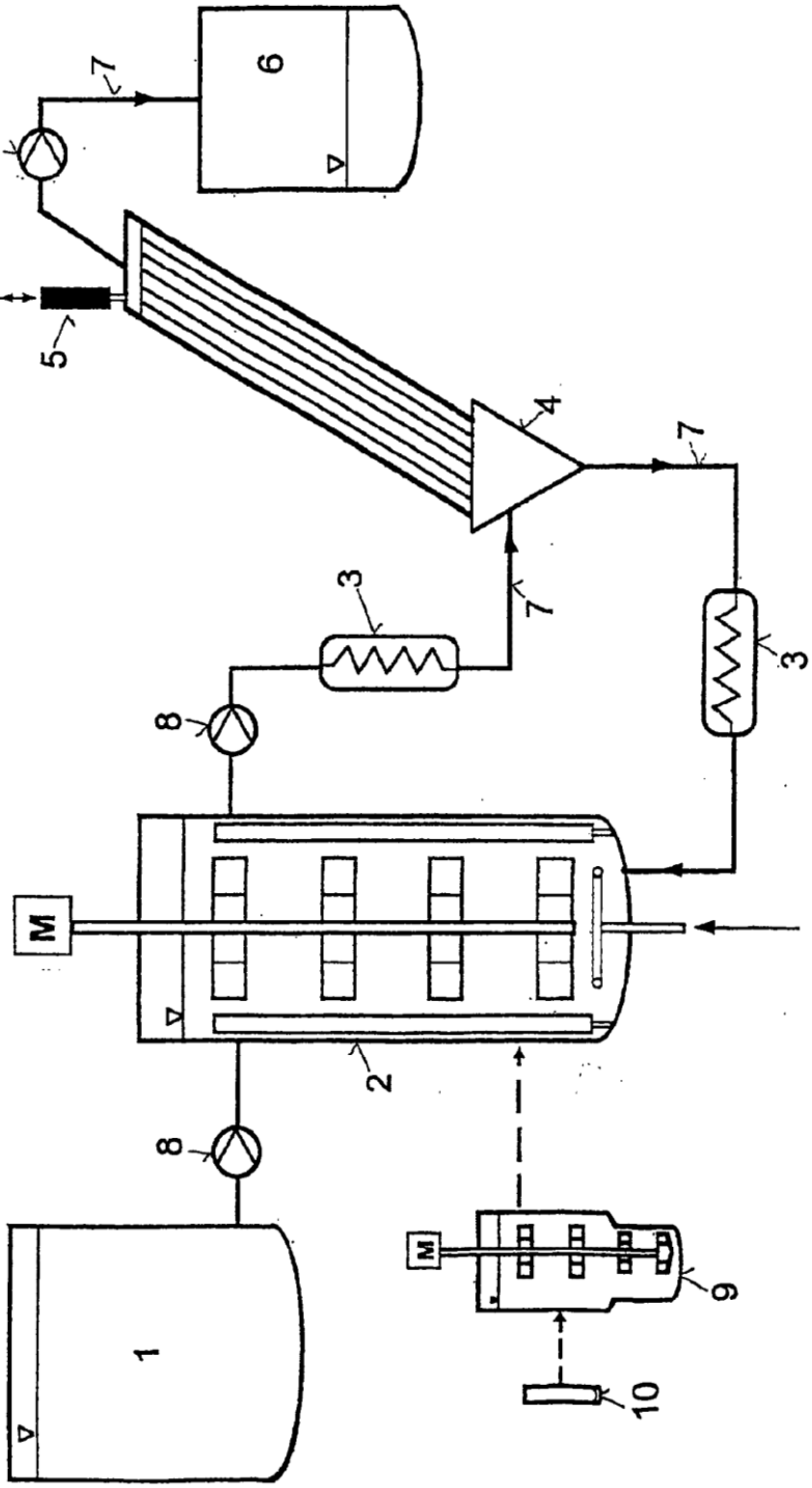


Fig. 1

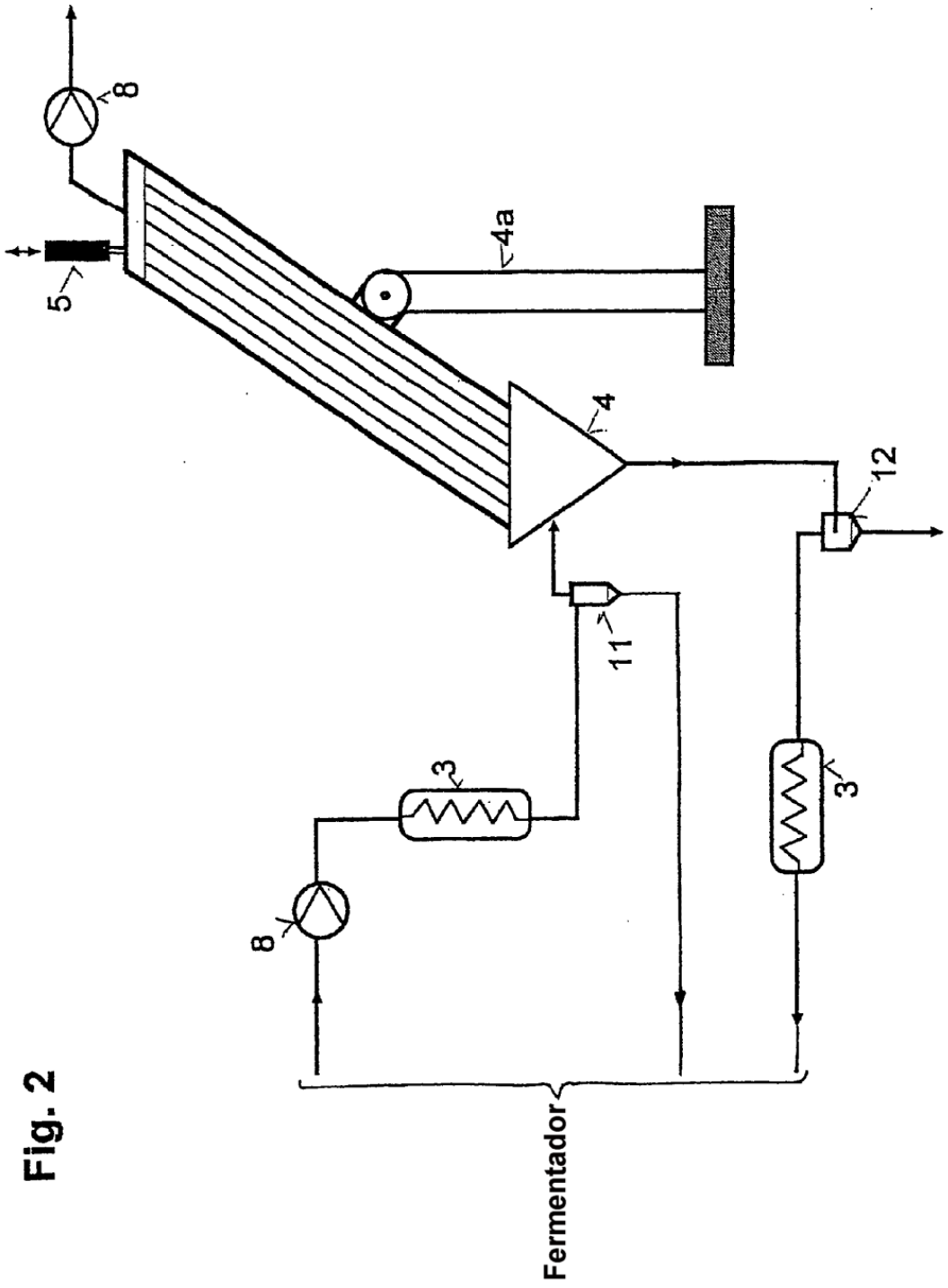


Fig. 2

Fig. 3

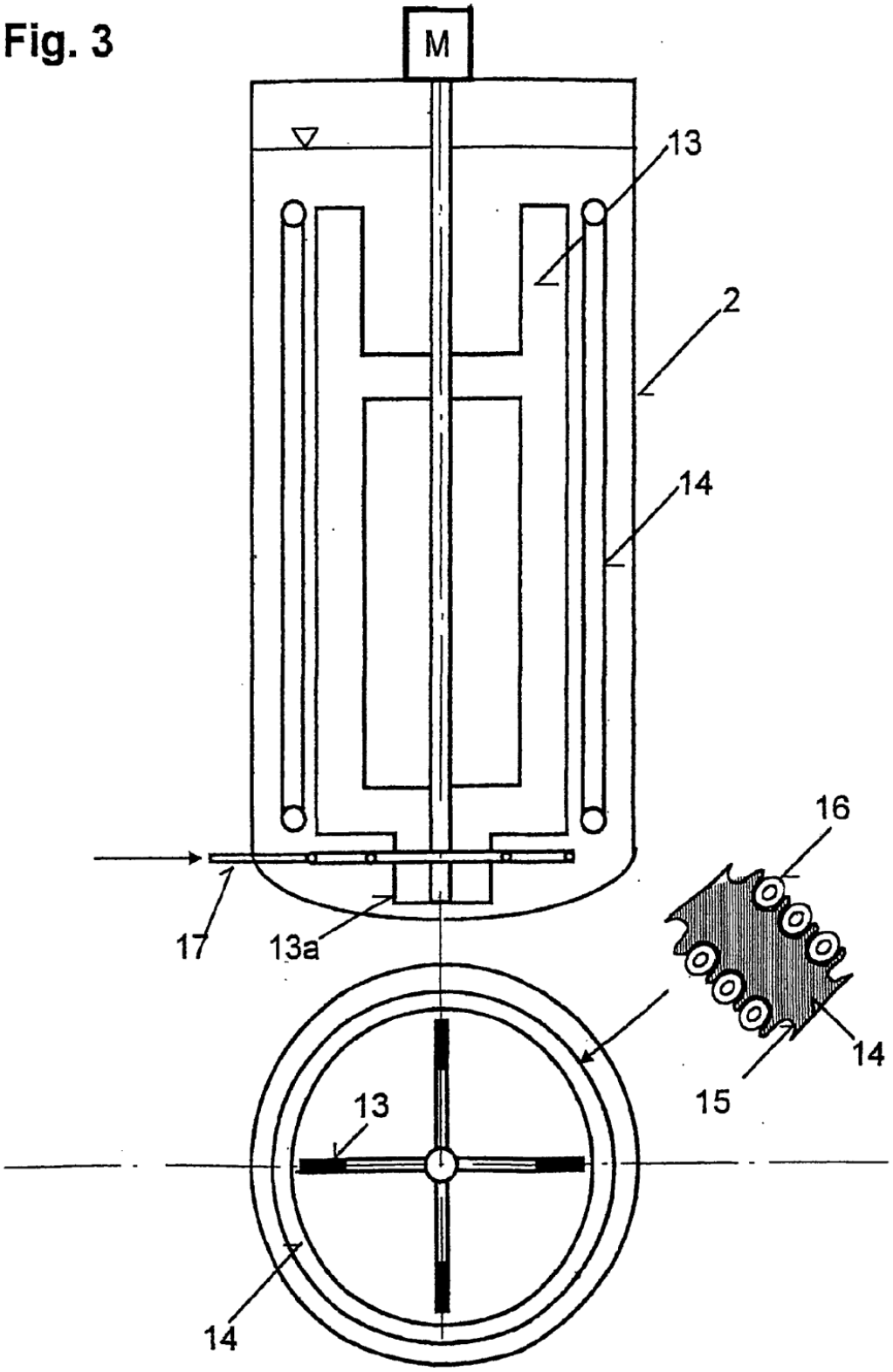


Fig. 4

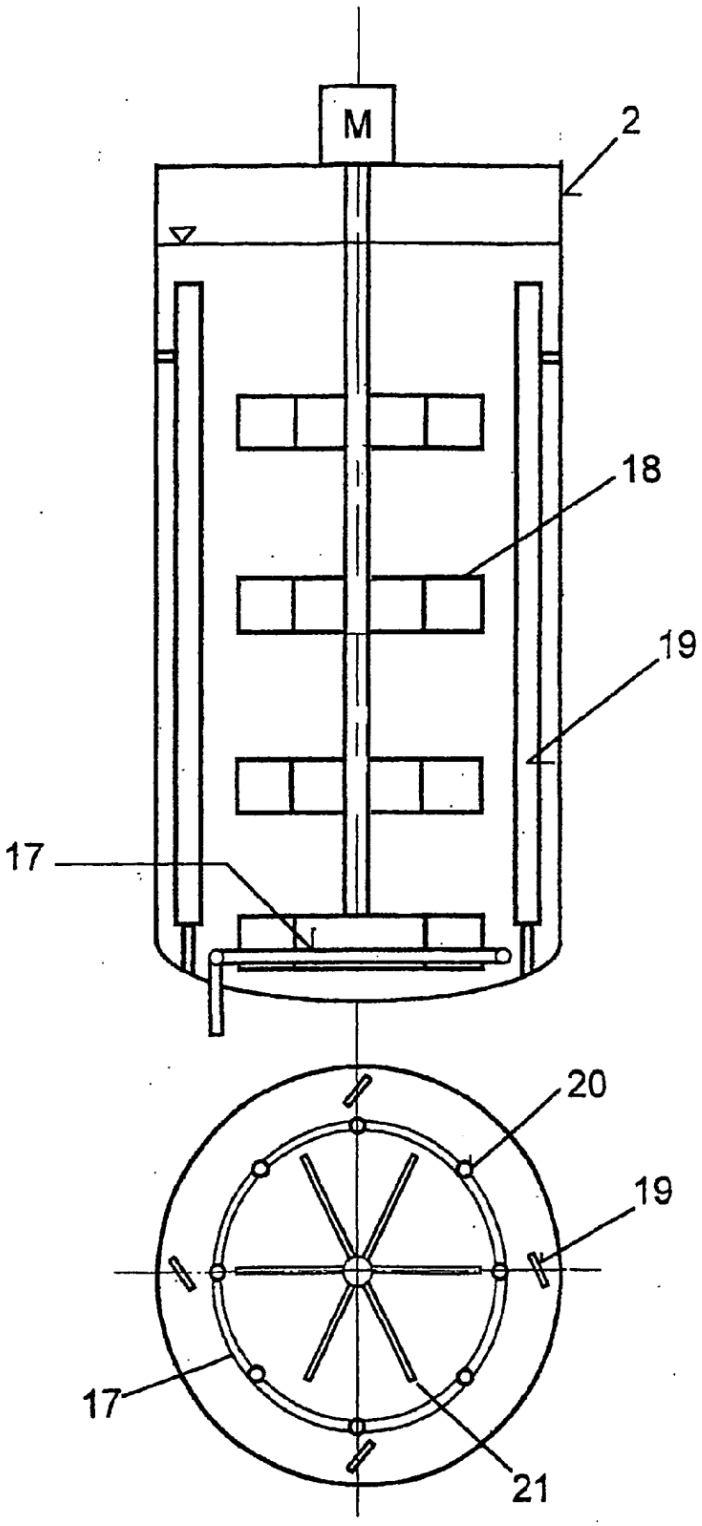


Fig. 5

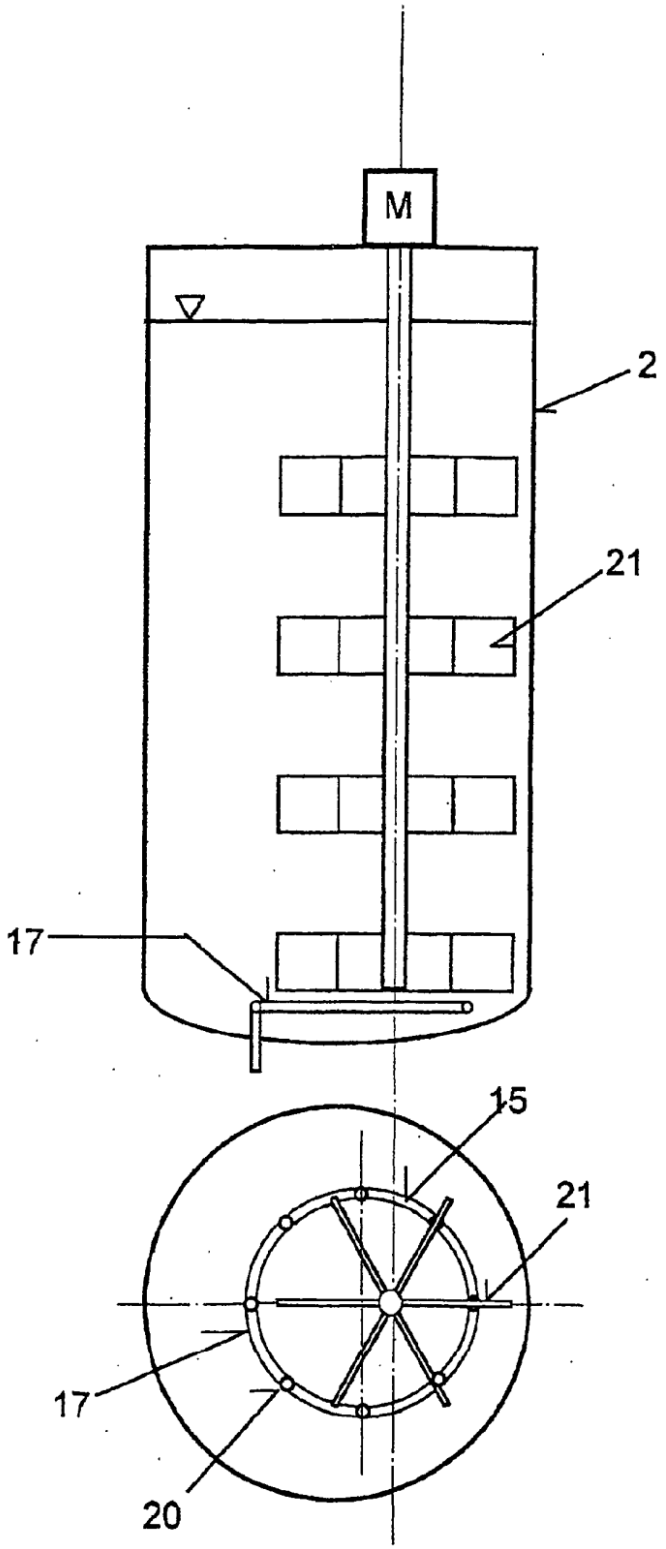


Fig. 6

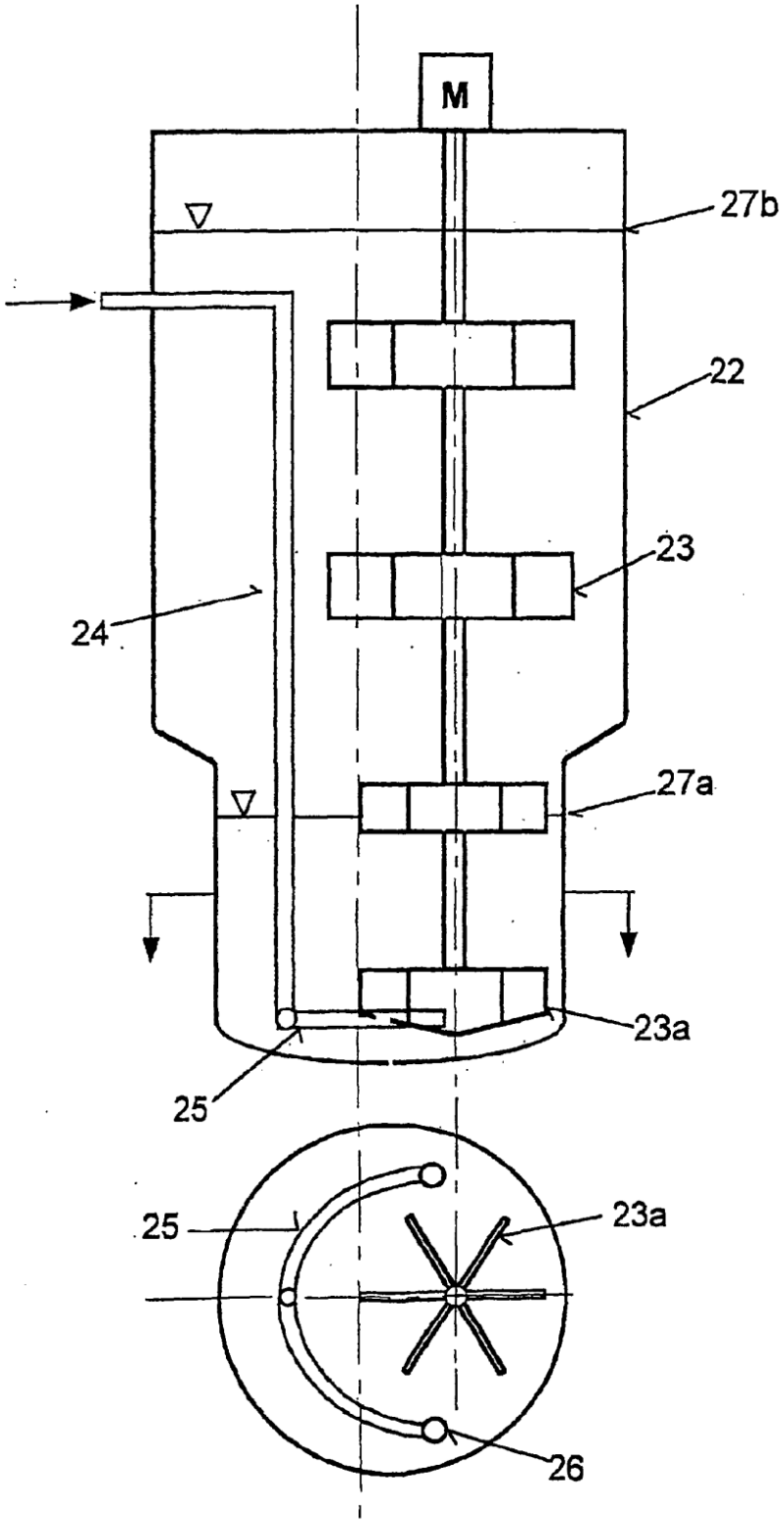
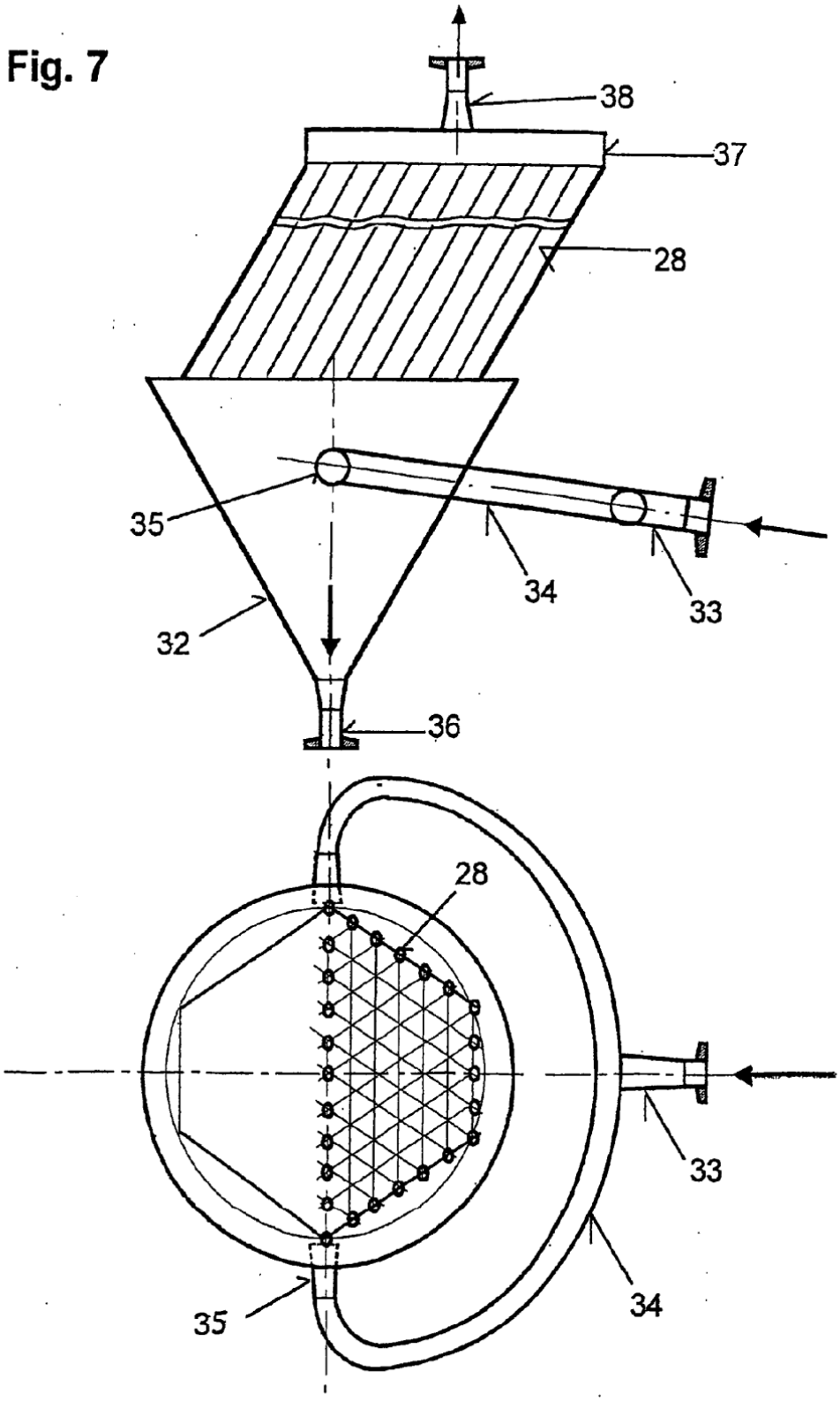
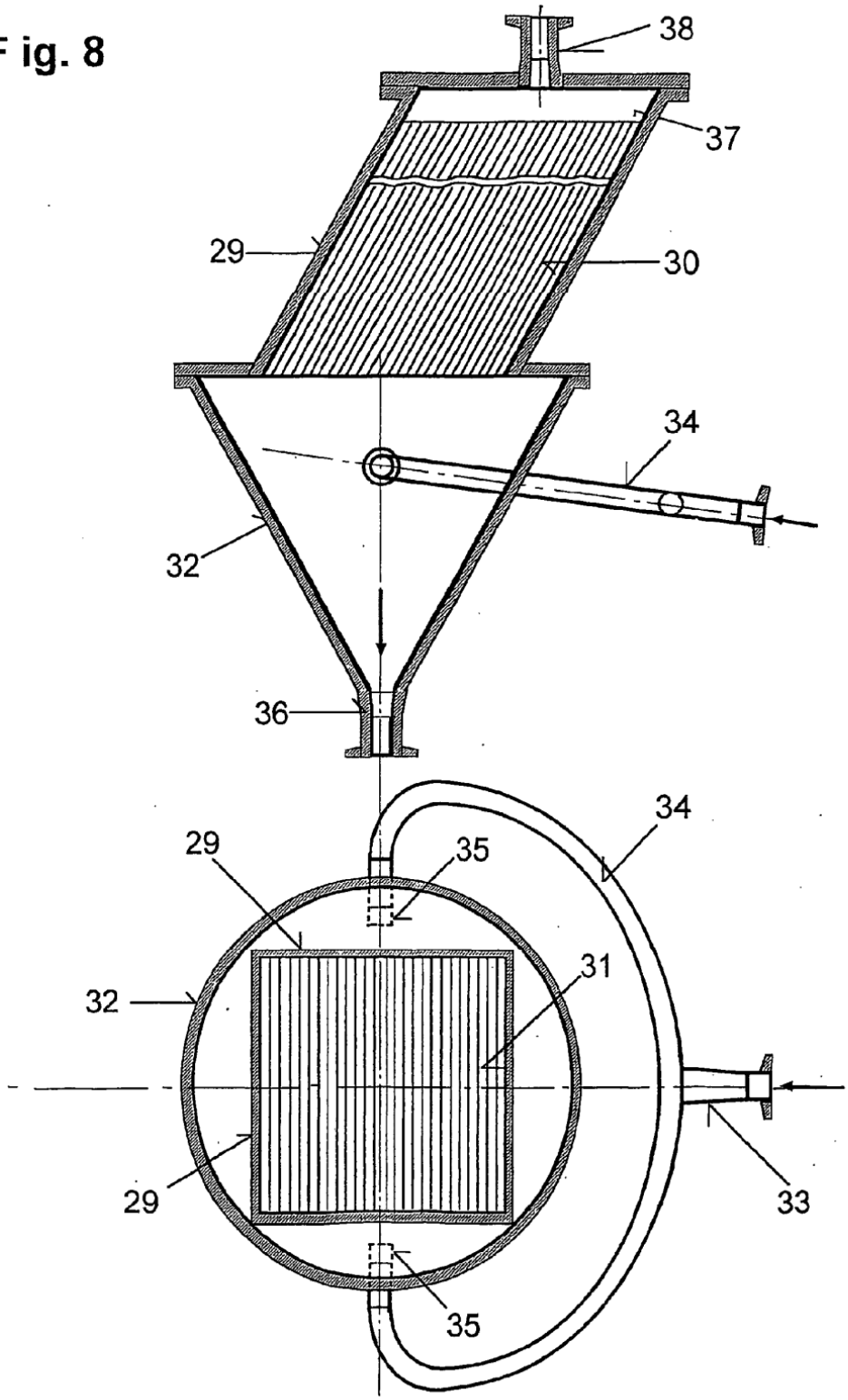


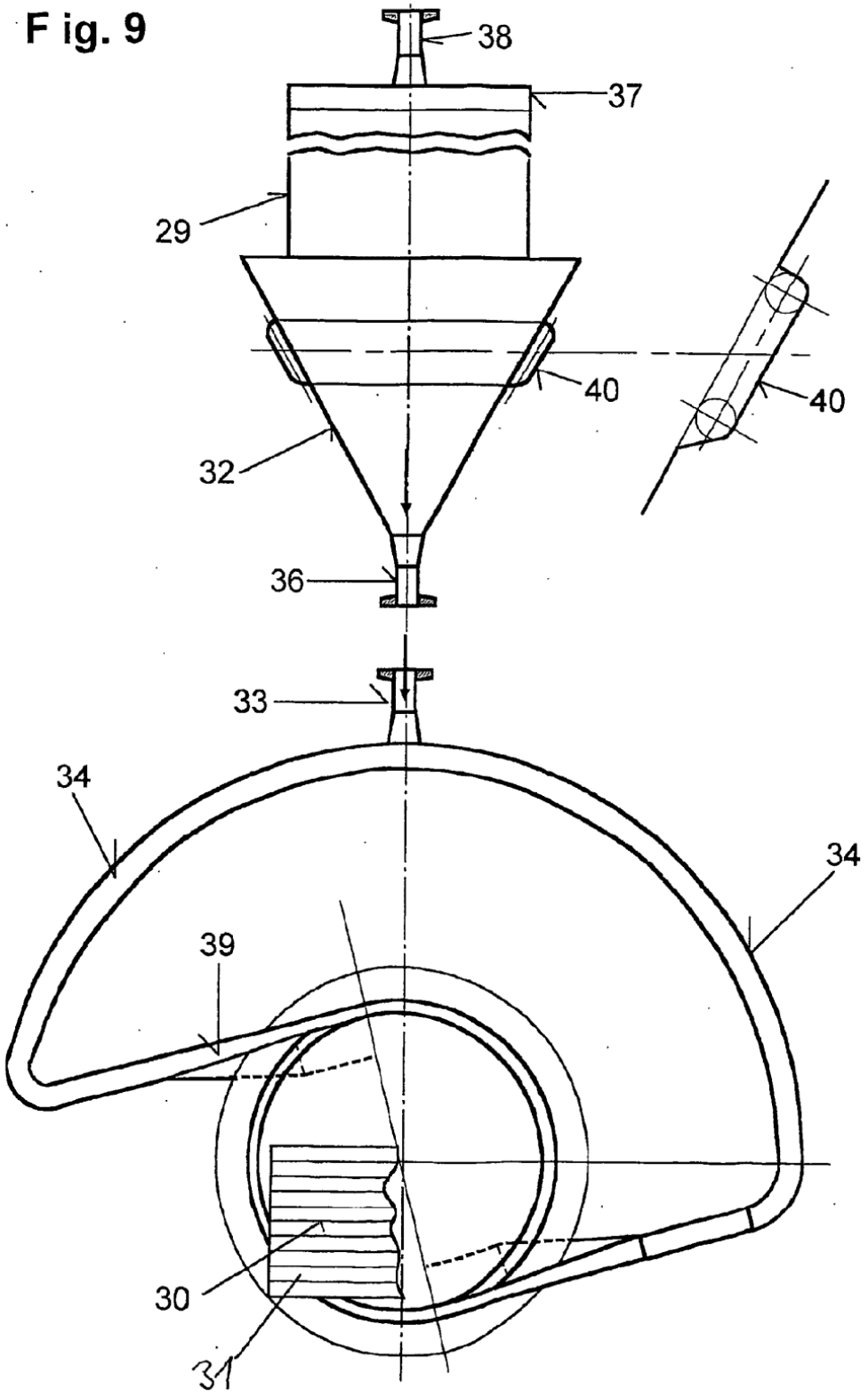
Fig. 7



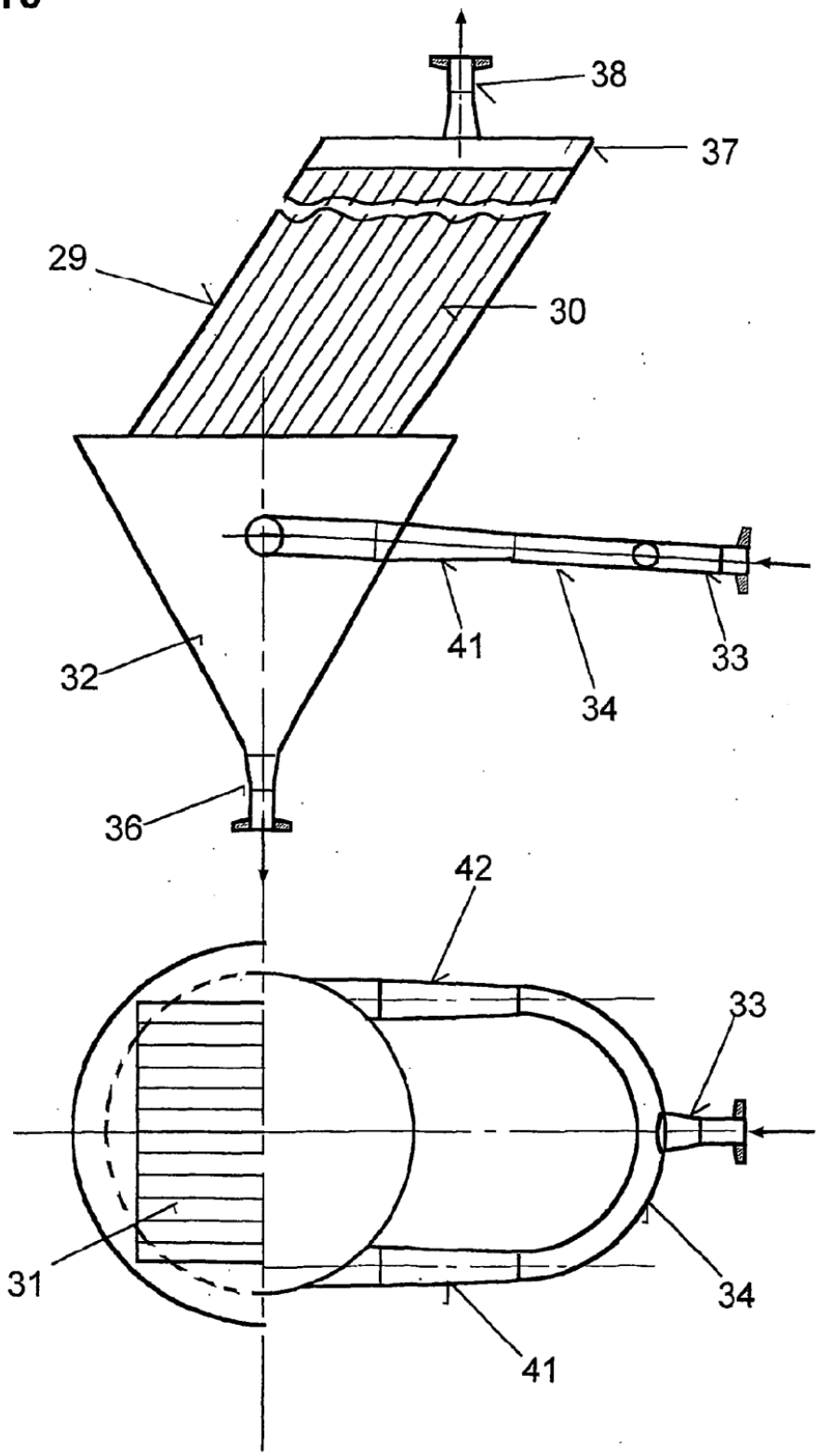
F ig. 8



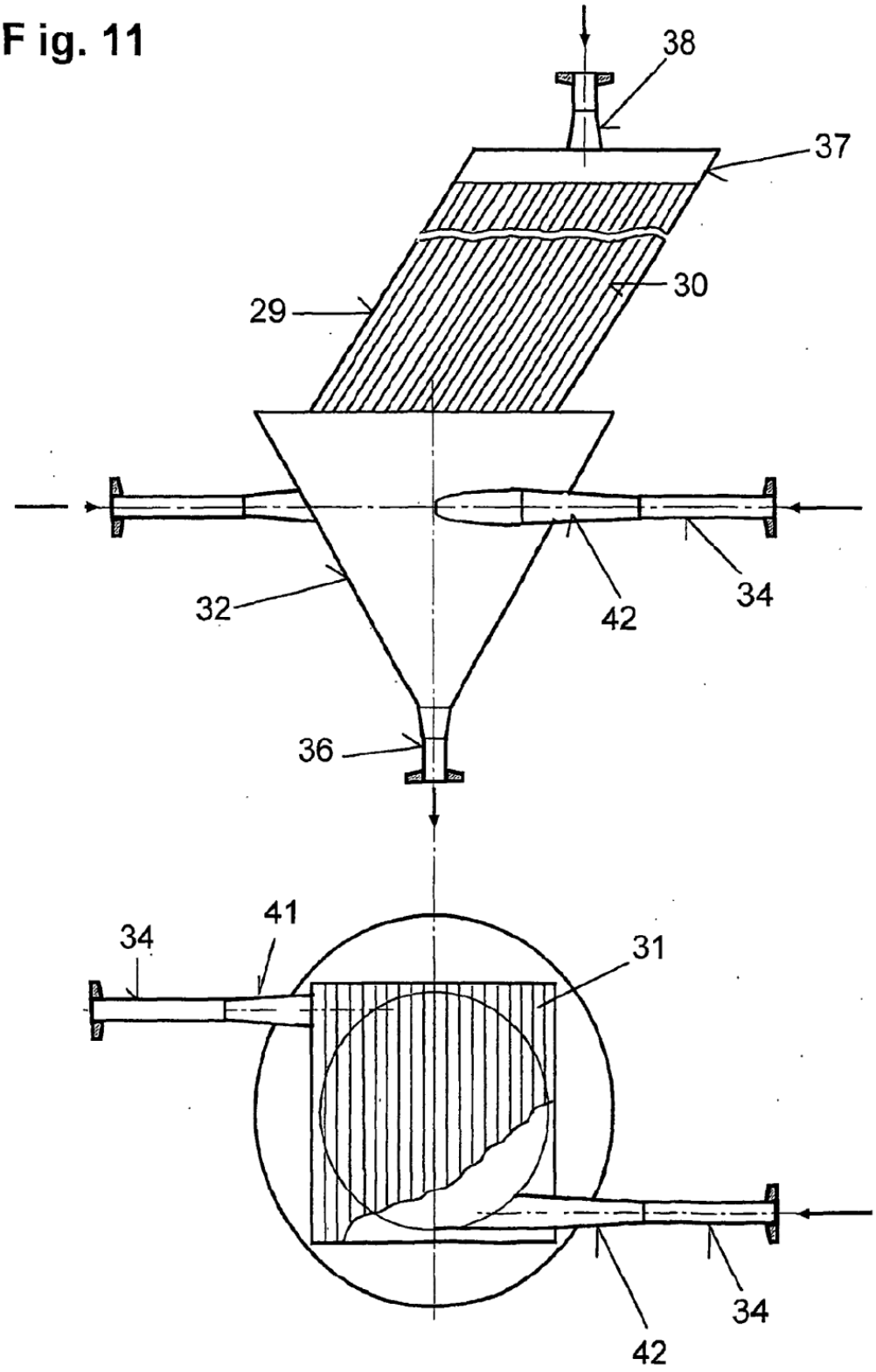
F ig. 9



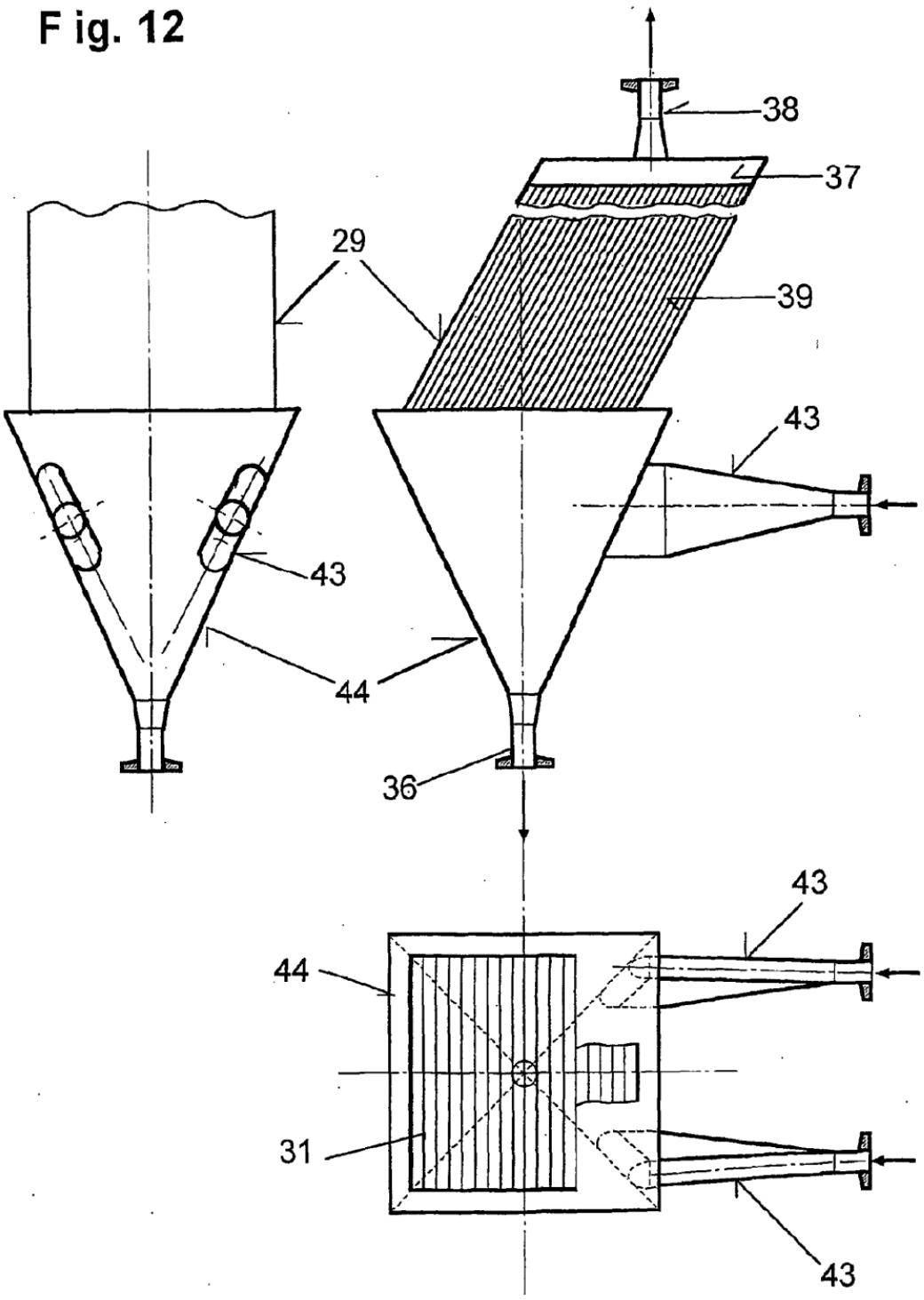
F ig. 10



F ig. 11



F ig. 12



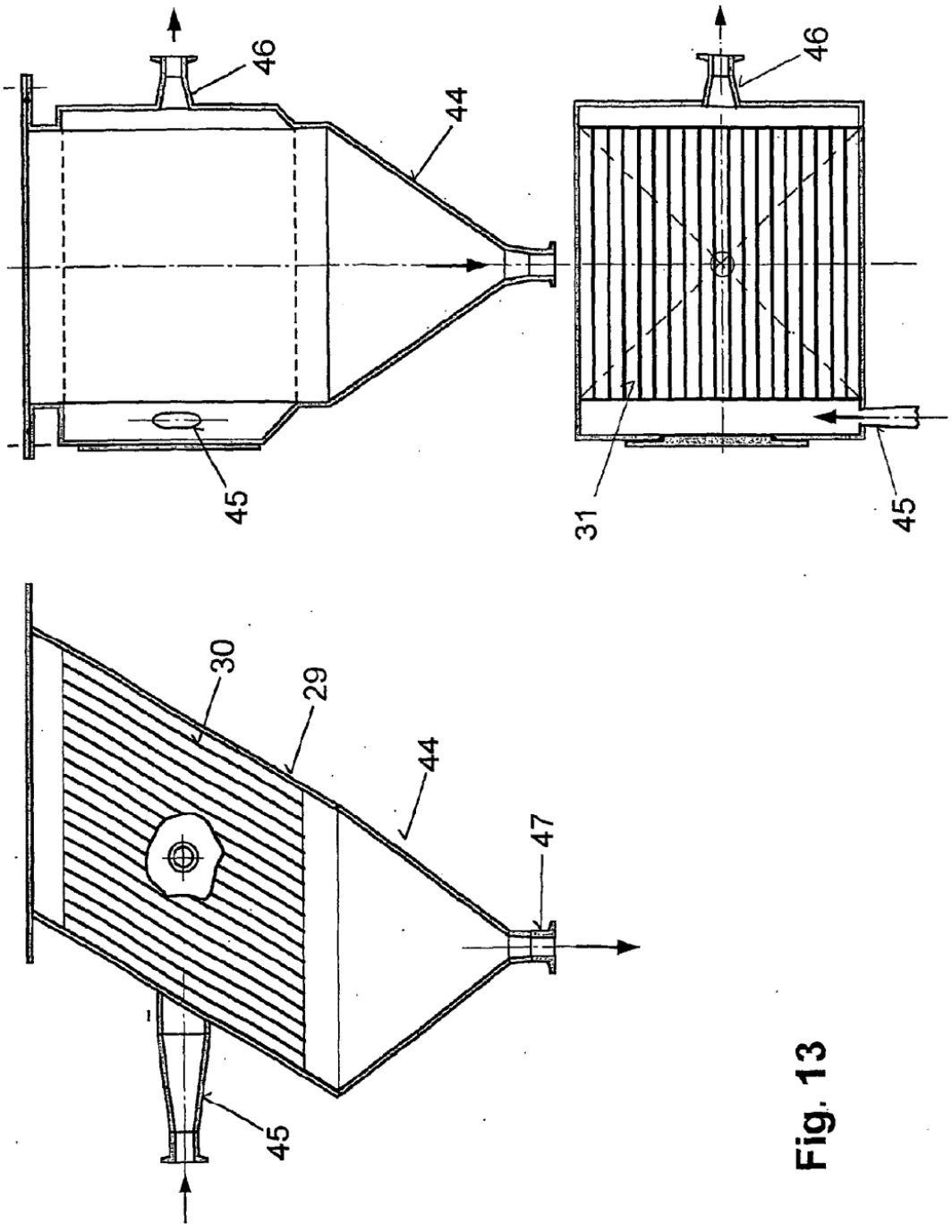


Fig. 13

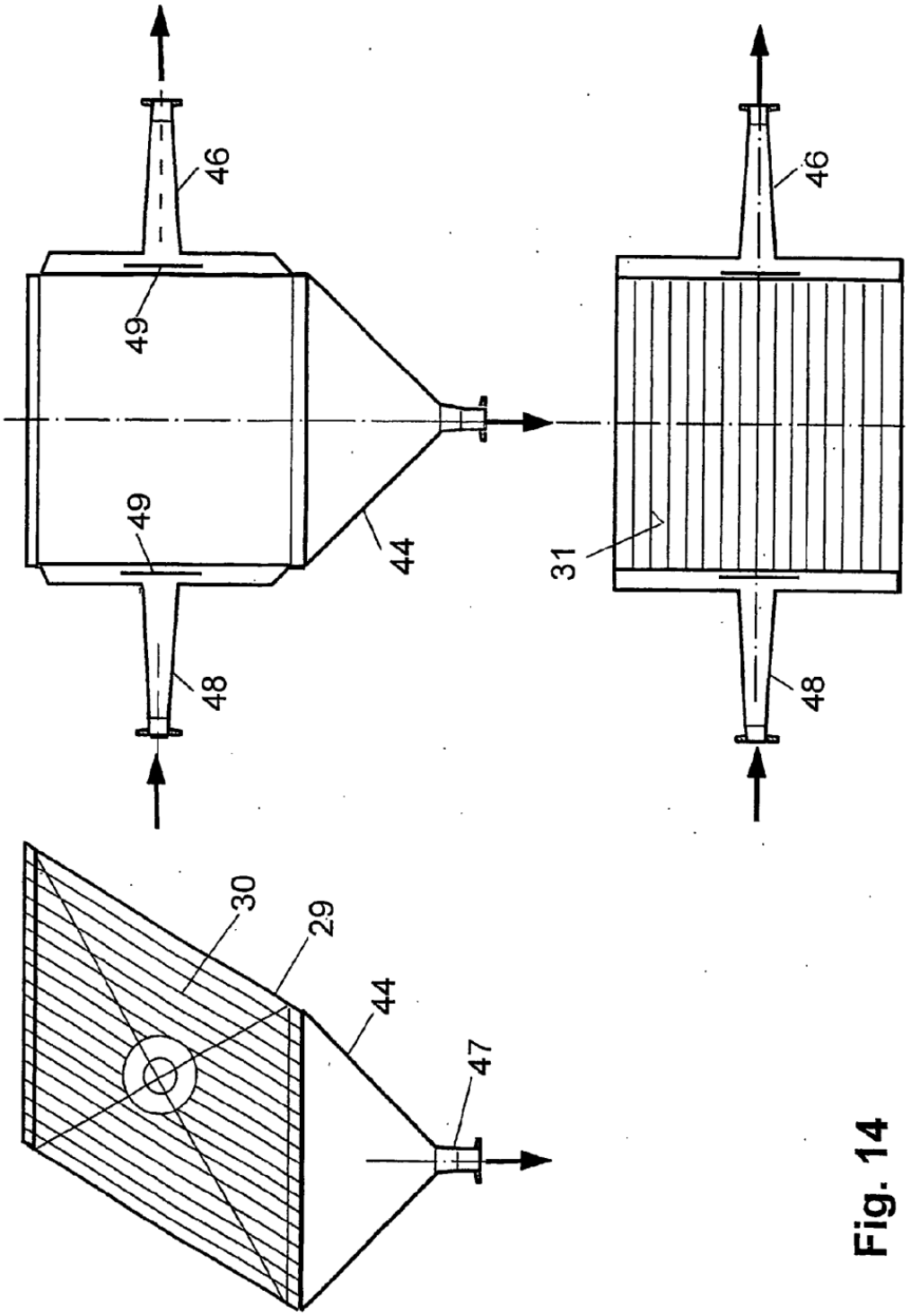
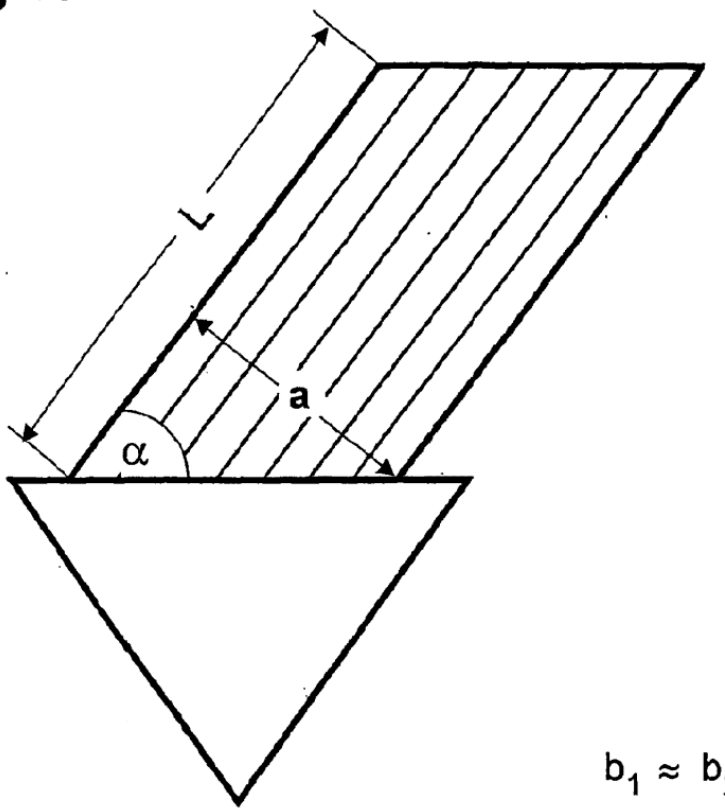
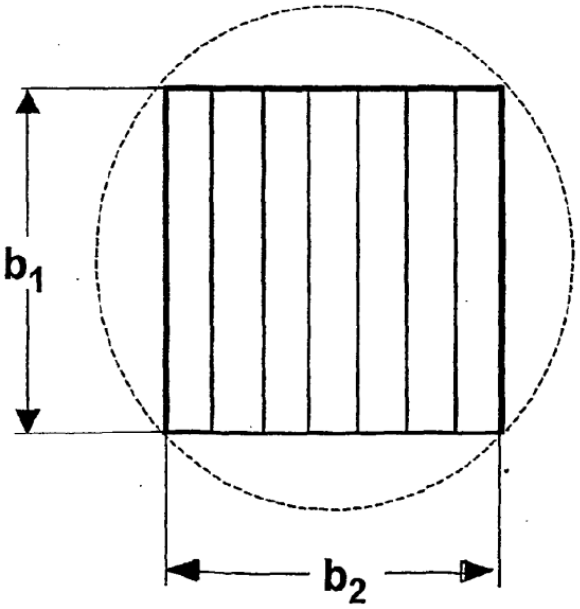


Fig. 14

Fig 15



$$b_1 \approx b_2 = \frac{a}{\operatorname{sen} \alpha}$$



$$\frac{a}{b_1} \approx \operatorname{sen} \alpha$$