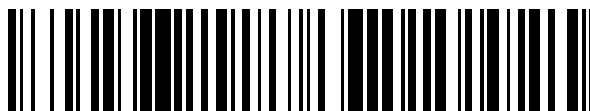


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 407 639**

51 Int. Cl.:

**C12P 7/56** (2006.01)

**C12N 15/09** (2006.01)

**C12R 1/865** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.02.2009 E 09708832 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2013 EP 2311969**

54 Título: **Procedimiento de producción de ácido láctico por fermentación continua**

30 Prioridad:

**04.02.2008 JP 2008023917**

**15.02.2008 JP 2008034462**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**13.06.2013**

73 Titular/es:

**TORAY INDUSTRIES, INC. (100.0%)  
1-1, Nihonbashi-Muromachi 2-chome Chuo-ku  
Tokyo 103-8666, JP**

72 Inventor/es:

**SASAKI, NANAMI;  
MORITA, KEN;  
MIMITSUKA, TAKASHI;  
SAWAI, HIDEKI y  
YAMADA, KATSUSHIGE**

74 Agente/Representante:

**TEMIÑO CENICEROS, Ignacio**

**ES 2 407 639 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).

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento de producción de ácido láctico por fermentación continua.

## 5 CAMPO TÉCNICO

La presente invención se refiere a un procedimiento para producir ácido láctico por fermentación continua, en el que se emplea una levadura poliploide que tiene la capacidad de producir ácido láctico para estabilizar el cultivo y la fermentación mediante la levadura, permitiendo así una producción eficaz a largo plazo de ácido láctico.

10

## TÉCNICA ANTECEDENTE

Los procedimientos de fermentación pueden clasificarse ampliamente en fermentación discontinua y fermentación discontinua alimentada, y fermentación continua. La fermentación discontinua y la fermentación discontinua alimentada pueden realizarse con un equipo sencillo y terminarse en poco tiempo y, por lo tanto, son menos propensas a tener contaminación, lo que es ventajoso. Sin embargo, existe el problema de que, como la concentración del producto aumenta con el tiempo, la productividad y el rendimiento disminuyen debido a la influencia de la presión osmótica, la inhibición del producto y/o similares. Por lo tanto, es difícil mantener la estabilidad, un alto rendimiento y una alta productividad durante mucho tiempo. La fermentación continua tiene la ventaja de que puede evitarse la acumulación de una sustancia deseada en el fermentador a alta concentración y, así puede mantenerse un alto rendimiento y una alta productividad durante mucho tiempo, pero es muy difícil que el cultivo continúe de forma estable por fermentación continua durante mucho tiempo, de manera que se han realizado investigaciones por ello.

25 Como una propuesta de fermentación continua, existe un procedimiento en el que los microorganismos o las células cultivadas se filtran a través de una membrana de separación y el producto se recupera a partir del filtrado, mientras que los microorganismos o las células cultivadas que se sometieron a la filtración se retienen o se reintroducen en el cultivo para mantener una alta concentración de microorganismos o células cultivadas en el cultivo.

30 Por ejemplo, se desvelan tecnologías en las que se realiza una fermentación continua en un dispositivo de fermentación continua que tiene una membrana cerámica (Bibliografías de Patente 1 a 3). Sin embargo, las tecnologías desveladas tienen problemas de descensos del caudal de filtración y la eficacia de la filtración debido a la obstrucción de la membrana cerámica, por lo que se realiza un lavado inverso o similar para evitar la obstrucción.

35 También se desvela un procedimiento para producir ácido succínico por fermentación continua (Bibliografía de Patente 5). En esta tecnología, se emplea una alta presión de filtración (aproximadamente 200 kPa) para la separación por membrana. Puesto que una alta presión de filtración es desventajosa no sólo en cuanto al coste sino también a un daño físico a los microorganismos o células por la presión durante la filtración, es inapropiada para la fermentación continua en la que los microorganismos o las células se reintroducen continuamente en el cultivo. En la Bibliografía de Patente 5, como fines para mantener la fermentación continua durante mucho tiempo, se desvelan tecnologías para la membrana de separación, la presión de filtración y similares, pero la duración de la fermentación continua es de aproximadamente 300 horas y, por lo tanto, se exige un procedimiento para mantener un cultivo continuo durante un mayor periodo de tiempo.

45 Por otro lado, se han realizado extensos estudios sobre los microorganismos que se usarán para la producción de ácidos orgánicos empleando levaduras que tienen altas tolerancias para los ácidos (Bibliografía de no relacionada con Patentes 1 y 2). En las levaduras, hay levaduras haploides que tienen únicamente conjuntos individuales de cromosomas y levaduras poliploides que tienen pluralidades de conjuntos de cromosomas. Las levaduras poliploides se usan principalmente como levaduras de panadería y levaduras de bebidas (Bibliografía de Patente 6 a 8). Se usan para la producción de alimentos y bebidas con el fin de mejorar el sabor y mejorar el procedimiento de producción, y no hay ninguna descripción de su uso para el cultivo continuo.

50 Además, se desvelan procedimientos para producir ácido láctico usando poliploides (Bibliografía de Patente 9 a 12). Estos emplean poliploides para aumentar el número de genes sintéticos de ácido láctico, pero el cultivo se realiza por fermentación discontinua alimentada y el tiempo de cultivo es tan corto como no más de 100 horas, y no hay ninguna descripción de la fermentación continua usando una membrana.

60 Además, se indicó la producción de ácido láctico usando una levadura protótrofa que no muestra auxotrofia (Bibliografía de Patente 13), pero también en este caso, el tiempo de cultivo es menor de 100 horas, y la fermentación discontinua alimentada es el único procedimiento desvelado como un procedimiento de fermentación.

Por lo tanto, la fermentación continua para mejorar la productividad, y el microorganismo que se usará para la fermentación se han estudiado por separado. En casos en los que se cultivaron microorganismos por fermentación

continua, que es ventajosa como un procedimiento de fermentación, la presión de filtración aumentó durante el cultivo y se hizo imposible continuar con el cultivo durante mucho tiempo, o la productividad del ácido láctico disminuyó ya que el cultivo continuó más tiempo, por lo que hasta ahora ha sido difícil permitir el ejercicio de ambas ventajas lo suficientemente. Por lo tanto, se ha demandado el desarrollo de una tecnología para una fermentación continua que resuelva estos problemas y permita una producción estable de ácido láctico durante mucho tiempo.

Bibliografía de Patente 1: JP 5-95778 A

Bibliografía de Patente 2: JP 62-138184 A

Bibliografía de Patente 3: JP 10-174594 A

Bibliografía de Patente 4: JP 2005-333886 A

Bibliografía de Patente 5: JP 2007-252367 A

Bibliografía de Patente 6: JP 2000-139326 A

Bibliografía de Patente 7: JP 2002-027974 A

Bibliografía de Patente 8: JP 2002-253212 A

Bibliografía de Patente 9: JP 2006-006271 A

Bibliografía de Patente 10: JP 2006-020602 A

Bibliografía de Patente 11: JP 2007-089466 A

Bibliografía de Patente 12: JP 2001-204464 A

Bibliografía de Patente 13: US 20050112737 A

Bibliografía de no relacionada con Patentes 1: Biotechnology progress, 11, 294-298 (1995)

Bibliografía de no relacionada con Patentes 2: Journal of fermentation and bioengineering, 86, 284-289 (1988)

## DIVULGACIÓN DE LA INVENCION

### PROBLEMAS A RESOLVER POR LA INVENCION

La presente invención tiempo por objeto proporcionar un procedimiento para la producción de ácido láctico por fermentación continua, por lo que puede mantenerse una alta productividad de ácido láctico durante mucho tiempo.

### MEDIOS PARA RESOLVER LOS PROBLEMAS

Los presentes inventores investigaron extensamente para descubrir que, con el fin de permitir que la levadura que produce ácido láctico mantenga una alta productividad de ácido láctico mientras que se repite de forma estable su proliferación durante mucho tiempo durante la fermentación continua, el mantenimiento de la alta productividad de ácido láctico durante mucho tiempo puede conseguirse empleando una levadura poliploide que tiene la capacidad de producir ácido láctico, completando así la presente invención. Es decir, la presente invención tiene la siguiente constitución.

(1) A procedimiento para producir ácido láctico por fermentación continua, en el que el cultivo de levadura poliploide que tiene la capacidad de producir ácido láctico se filtra a través de una membrana porosa que tiene un tamaño de poro medio de un mínimo de 0,01  $\mu\text{m}$  y menos de 1  $\mu\text{m}$  y el producto se recupera a partir del filtrado, mientras que el líquido no filtrado se retiene o se reintroduce en el cultivo y al cultivo se le añade una materia prima de fermentación.

(2) El procedimiento para producir ácido láctico de acuerdo con (1), en el que dicha filtración se realiza con una diferencia de presión transmembrana de la membrana porosa dentro del intervalo de 0,1 kPa a menos de 20 kPa.

(3) El procedimiento para producir ácido láctico de acuerdo con (1) ó (2), en el que la levadura poliploide es diploide.

(4) El procedimiento para producir ácido láctico de acuerdo con uno cualquiera de (1) a (3), en el que la levadura poliploide es protótrofa.

(5) El procedimiento para producir ácido láctico de acuerdo con uno cualquiera de (1) a (4), en el que el rendimiento del ácido láctico con respecto a los sacáridos en la fermentación continua es un mínimo del 70%.

(6) El procedimiento para producir ácido láctico de acuerdo con uno cualquiera de (1) a (5), en el que la concentración de ácido láctico acumulado en el cultivo sometido a la fermentación continua es un mínimo de 40 g/l.

(7) El procedimiento para producir ácido láctico de acuerdo con uno cualquiera de (1) a (6), en el que la velocidad de producción de ácido láctico durante la fermentación continua es un mínimo de 7,5 g/l.

(8) El procedimiento para producir ácido láctico de acuerdo con uno cualquiera de (5) a (7), en el que la fermentación continua se mantiene durante un mínimo de 400 horas.

(9) El procedimiento para producir ácido láctico de acuerdo con uno cualquiera de (1) a (8), en el que la levadura poliploide pertenece al género *Saccharomyces*.

5 (10) El procedimiento para producir ácido láctico de acuerdo con uno cualquiera de (1) a (9), en el que la levadura poliploide es *Saccharomyces cerevisiae*.

#### EFECTO DE LA INVENCION

10 De acuerdo con la presente invención, usando una levadura poliploide, es posible que la fermentación continua permita un mantenimiento estable de una alta productividad de ácido láctico como el producto de fermentación deseado durante mucho tiempo, permitiendo así una producción estable de ácido láctico a un bajo coste.

#### BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

15 La figura 1 es una vista lateral esquemática para la explicación de una realización del dispositivo de fermentación continua del tipo separación por membrana usado en la presente invención;  
 la figura 2 es una vista lateral esquemática para la explicación de otra realización del dispositivo de fermentación continua del tipo separación por membrana usado en la presente invención;  
 20 la figura 3 es una vista en perspectiva esquemática para la explicación de una realización del elemento de membrana de separación usado en la presente invención;  
 la figura 4 es una vista en perspectiva esquemática para la explicación de otro ejemplo del elemento de la membrana de separación usado en la presente invención;  
 la figura 5 es un vector para la expresión de un gen de lactato deshidrogenasa;  
 25 la figura 6 muestra cambios en la concentración del ácido láctico acumulado en los Ejemplos 13 y 14 y los Ejemplos Comparativos 16 y 17;  
 la figura 7 muestra en los rendimientos del ácido láctico con respecto a la glucosa en los Ejemplos 13 y 14 y los Ejemplos Comparativos 16 y 17;  
 la figura 8 muestra cambios en las velocidades de producción de ácido láctico en los Ejemplos 13 y 14 y los  
 30 Ejemplos Comparativos 16 y 17;  
 la figura 9 muestra cambios en la concentración de ácido láctico acumulado en los Ejemplos 15 y 16 y los Ejemplos Comparativos 18 y 19;  
 la figura 10 muestra cambios en los rendimientos del ácido láctico con respecto a la glucosa en los Ejemplos 15 y 16 y los Ejemplos Comparativos 18 y 19;  
 35 la figura 11 muestra cambios en las velocidades de producción de ácido láctico en los Ejemplos 15 y 16 y los Ejemplos Comparativos 18 y 19.

#### DESCRIPCION DE SÍMBOLOS

1. Recipiente de reacción de fermentación
2. Elemento de membrana de separación
3. Aparato de control de la diferencia del cabeza hidráulico
4. Aparato de suministro de gas
5. Agitador
6. Detector de nivel
7. Bomba de suministro del medio de cultivo
8. Bomba de suministro de una solución de ajuste del pH
9. Aparato de control del detector de pH
10. Controlador de temperatura
11. Bomba circulante de líquido de fermentación
12. Recipiente de separación por membrana
13. Placa de soporte
14. Material de canal
15. Membrana de separación
16. concavidad
17. Tubería de recolección de líquido
18. Manejo de membranas de separación
19. Capa de sellado de resina superior
20. Capa de sellado de resina inferior
21. Marco de soporte
22. Tubería de recolección de líquido

## MEJOR MODO DE REALIZAR LA INVENCION

La presente invención es un procedimiento para producir ácido láctico por fermentación continua al mismo tiempo que, en la fermentación mediante el cultivo de levadura que tiene la capacidad de producir ácido láctico, se mantiene una alta productividad de ácido láctico durante mucho tiempo usando una levadura poliploide, en el que, durante la fermentación continua, el cultivo de la levadura poliploide que tiene la capacidad de producir ácido láctico se filtra a través de una membrana de separación y el producto se recupera a partir del filtrado, permitiendo al mismo tiempo que el líquido no filtrado quede retenido en o se reintroduzca en el cultivo y añadiendo una materia prima de fermentación al cultivo, cuya membrana de separación tiene un tamaño de poro medio de no más de 0,01  $\mu\text{m}$  y menos de 1  $\mu\text{m}$ .

En primer lugar, se describirá la membrana porosa usada en la presente invención como una membrana de separación. La membrana porosa en la presente invención tiene preferiblemente un rendimiento de separación y una permeabilidad que dependen de las propiedades y el uso del líquido que se procesará. La membrana porosa tiene preferiblemente una capa de resina porosa en vista del rendimiento de bloqueo, la permeabilidad y el rendimiento de la separación, por ejemplo, resistencia a la suciedad.

La membrana porosa que comprende una capa de resina porosa tiene preferiblemente una capa de resina porosa sobre la superficie de un material de base porosa, cuya capa actúa como una capa de la función de separación. Aquí, el material del material de base porosa comprende un material orgánico, un material inorgánico y/o similares, y se usa preferiblemente un material orgánico, más preferiblemente una fibra orgánica. Los ejemplos del material de base porosa preferidos entre estos incluyen tejidos y tejidos no tejidos usando fibras orgánicas, tales como fibras de celulosa, fibras de triacetato de celulosa, fibras de poliéster, fibras de polipropileno y fibras de polietileno, y se usa preferiblemente un tejido no tejido cuya densidad puede controlarse relativamente de forma fácil, cuya producción es fácil y que es económica. El espesor del material de base porosa es preferiblemente menor de 50  $\mu\text{m}$  y no más de 3.000  $\mu\text{m}$  en vista del soporte de la capa de resina porosa y la resistencia de la membrana de separación. El material de base porosa puede estar impregnarse, o no, con la capa de resina porosa, que se selecciona dependiendo del uso.

Como la capa de resina porosa, puede usarse adecuadamente una membrana polimérica orgánica. Los ejemplos del material de la membrana polimérica orgánica incluyen resinas de polietileno, resinas de polipropileno, resinas de cloruro de polivinilo, resinas de fluoruro de polivinilideno, resinas de polisulfona, resinas de polietersulfona, resinas de poliacrilonitrilo, resinas de poliolefina, resinas de celulosa y resinas de triacetato de celulosa, y el material puede ser una mezcla de resinas que contiene estas resinas en forma del componente principal. Aquí, el componente principal se refiere a que el componente está contenido en una cantidad no inferior del 50% en peso, preferiblemente no inferior al 60% en peso. Los ejemplos preferidos del material de la membrana polimérica orgánica incluyen especialmente aquellos que pueden formarse fácilmente por una solución y tienen una excelente durabilidad física y resistencia química, tales como resinas de cloruro de polivinilo, resinas de fluoruro de polivinilideno, resinas de polisulfona, resinas de polietersulfona, resinas de poliacrilonitrilo y resinas de poliolefina, y mezclas de resinas que contienen estas resinas en forma del componente principal. Se usa más preferiblemente una resina de fluoruro de polivinilideno o una mezcla de resinas que la contienen en forma del componente principal.

Aquí, como la resina de fluoruro de polivinilideno, se usa preferiblemente un homopolímero de fluoruro de vinilideno o un copolímero con monómeros de vinilo capaces de copolimerizarse con fluoruro de vinilideno. Los ejemplos de los monómeros de vinilo capaces de copolimerizarse con fluoruro de vinilideno incluyen tetrafluoroetileno, hexafluoropropileno y tricloruro de fluoruro de etileno.

Los ejemplos de las resinas de poliolefina incluyen polietileno, polipropileno, polietileno clorado y polipropileno clorado, y se usa preferiblemente polietileno clorado.

Es importante para la membrana porosa usada en la presente invención tener un tamaño de poro superficial medio de no menos de 0,01  $\mu\text{m}$ . Con un tamaño de poro superficial medio de la membrana porosa de no menos de 0,01  $\mu\text{m}$ , la membrana es menos propensa a la obstrucción por las células de levadura usadas para la fermentación, y tiene la propiedad de mantener de forma estable el rendimiento de la filtración durante mucho tiempo. Además, con un tamaño de poro medio de la membrana porosa de no menos de 0,01  $\mu\text{m}$ , puede conseguirse tanto un alto rendimiento de bloqueo que no permite la fuga de las levaduras poliploides como una alta permeabilidad, y la permeabilidad puede mantenerse con alta precisión y reproducibilidad durante mucho tiempo. En casos en los que el tamaño de poro superficial medio de la membrana porosa en la presente invención es menos de 0,01  $\mu\text{m}$ , la permeabilidad de la membrana porosa disminuye, y en algunos casos, es imposible una operación eficaz, incluso si la membrana no está sucia. En casos en los que el tamaño de poro medio de la membrana porosa es de un mínimo de 0,01  $\mu\text{m}$ , preferiblemente no menos de 0,02  $\mu\text{m}$ , más preferiblemente no menos de 0,04  $\mu\text{m}$ , es posible una operación eficaz.

Es importante para la membrana porosa de la presente invención tener un tamaño de poro medio de menos de 1  $\mu\text{m}$ , preferiblemente menor de 0,4  $\mu\text{m}$ , más preferiblemente menor de 0,2  $\mu\text{m}$  con el fin de evitar el escape de la levadura poliploide, es decir, la aparición de un problema de disminución de la velocidad de eliminación, y para impedir la obstrucción directa de los poros por la levadura poliploide. Además, en algunos casos, la levadura poliploide produce sustancias distintas de ácido láctico, que es la sustancia de interés, tales como proteínas y sacáridos que son propensos a la agregación, y también hay casos en los que se producen restos celulares por la muerte de una parte de la levadura poliploide en el cultivo. Por lo tanto, para evitar la obstrucción de la membrana porosa por dichas sustancias, es más preferido un tamaño de poro medio de no más de 0,1  $\mu\text{m}$ . Por lo tanto, el tamaño de poro superficial medio de la membrana porosa usada en la presente invención no es preferiblemente de más de 0,4  $\mu\text{m}$ , más preferiblemente de no más de 0,2  $\mu\text{m}$ , especialmente preferiblemente no más de 0,1  $\mu\text{m}$ .

Aquí, el tamaño de poro superficial medio en la presente invención puede determinarse observando la superficie de la membrana porosa con un microscopio electrónico de barrido a un aumento de 10.000 x para medir el diámetro de todos los poros que pueden observarse en un área de 9,2  $\mu\text{m}$  x  $\mu\text{m}$  x 10,4  $\mu\text{m}$ , y calculado el promedio de los diámetros. Como alternativa, el tamaño de poro medio puede determinarse mediante un procedimiento en el que se toma una imagen de la superficie de la membrana usando un microscopio electrónico de barrido a un aumento de 10.000 x, y pueden seleccionarse de forma aleatoria un mínimo de 10, preferiblemente un mínimo de 20 seguido de la medición de los diámetros de estos poros y calculando el promedio numérico. En casos en los que un poro no es circular, el tamaño de poro medio puede determinarse por un procedimiento en el que se determina un círculo que tiene el área equivalente al del poro (círculo equivalente) usando un dispositivo de procesamiento de imágenes o similar, y el diámetro del círculo equivalente es considerado como el diámetro del poro.

En cuanto al tamaño de poro superficial medio de la membrana porosa usada en la presente invención, en casos en los que la desviación típica del tamaño de los poros es pequeña, es decir, en casos en los que el tamaño de los poros es uniforme, es más probable que se obtenga un líquido permeado uniforme, y la desviación típica  $\sigma$  no es preferiblemente más de 0,1  $\mu\text{m}$ . Además, en vista de la facilidad de manejo de la operación de fermentación, la desviación típica del tamaño de poro medio es preferiblemente lo más pequeña posible. La desviación típica  $\sigma$  del tamaño de poro medio se calcula de acuerdo con la (Ecuación 1) que se indica a continuación, en la que N representa el número de poros que pueden observarse en un área de 9,2  $\mu\text{m}$  x 10,4  $\mu\text{m}$  en la observación que se ha mencionado anteriormente de la superficie de la membrana porosa con un microscopio electrónico de barrido a un aumento de 10.000 x,  $X_k$  representa los diámetros respectivos observados, y  $X(\text{med.})$  representa la media del tamaño de los poros.

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{k=1}^N (X_k - X(\text{med.}))^2}{N}} \quad \text{(Ecuación 1)}$$

En la membrana porosa usada en la presente invención, la permeabilidad al cultivo es una de sus propiedades importantes. Como un índice para la permeabilidad de la membrana porosa, puede usarse el coeficiente de permeabilidad al agua pura de la membrana porosa antes del uso. En la presente invención, el coeficiente de permeabilidad al agua pura de la membrana porosa no es preferiblemente menos de  $2 \times 10^{-9} \text{ m}^3/\text{m}^2/\text{s}/\text{pa}$  cuando la cantidad de permeación se mide usando, como el agua sin procesar, agua potable filtrada a través de una membrana de diálisis (Filtalyzer B2-1,5H fabricado por Toray Industries, Inc.) a 25 °C con una altura de cabezal de 1 m, y en casos en los que el coeficiente de permeabilidad al agua pura es un mínimo de  $2 \times 10^{-9} \text{ m}^3/\text{m}^2/\text{s}/\text{pa}$  y no más de  $6 \times 10^{-7} \text{ m}^3/\text{m}^2/\text{s}/\text{pa}$ , puede obtenerse una cantidad de permeación de agua que es prácticamente suficiente. Más preferiblemente, el coeficiente de permeabilidad al agua pura es un mínimo de  $2 \times 10^{-9} \text{ m}^3/\text{m}^2/\text{s}/\text{pa}$  y no más de  $1 \times 10^{-7} \text{ m}^3/\text{m}^2/\text{s}/\text{pa}$ .

La rugosidad de la superficie de la membrana en la membrana porosa usada en la presente invención es el valor medio de la altura desde la superficie en la dirección vertical. La rugosidad de la superficie de la membrana es uno de los factores que permite el fácil desprendimiento de la levadura poliploide adherida a la superficie de la membrana de separación por el efecto del lavado de la superficie de la membrana de la corriente líquida producida por agitación o una bomba circulante. La rugosidad superficial de la membrana porosa no es preferiblemente de más de 0,1  $\mu\text{m}$ . En casos en los que la rugosidad de la superficie de la membrana no es de más de 0,1  $\mu\text{m}$ , la levadura poliploide adherida a la membrana puede desprenderse fácilmente y la fuerza de cizalladura producida sobre la superficie de la membrana puede reducirse durante la filtración de la levadura poliploide. Por lo tanto, la destrucción de la levadura se suprime, y también se suprime la obstrucción de la membrana porosa, de manera que pueda realizarse una filtración estable durante mucho tiempo, y, puesto que la fermentación continua puede realizarse con una diferencia de presión transmembrana inferior, incluso en casos en los que la membrana se obstruyó, puede

5 obtenerse un mejor rendimiento de recuperación en el lavado en comparación con los casos en los que la operación se realizó con una diferencia de presión transmembrana superior. Puesto que la fermentación continua estable es posible suprimiendo la obstrucción, la rugosidad superficial de la membrana porosa es preferiblemente lo más pequeña posible.

10 Aquí, la rugosidad de la superficie de la membrana se mide usando el siguiente microscopio de fuerza atómica (AFM) en las siguientes condiciones.

Dispositivo: Microscopio de fuerza atómica (Nanoscope IIIa fabricado por Digital Instruments)

Condiciones

Sonda: cantiléver SiN (fabricada por Digital Instruments)

Modo barrido-modo contacto (medición en aire)

Modo de contacto intermitente bajo el agua (medición en agua)

Área de barrido: 10 μm x 10 μm, 25 μm x 25 μm (medición en aire)

5 μm x 5 μm, 10 μm x 10 μm (medición en agua)

Resolución de barrido: 512 x 512

Preparación de muestra: Cuando se realizó la medición, la muestra de membrana se dejó en remojo en etanol a temperatura ambiente durante 15 minutos y después se dejó en remojo en agua OI durante 24 horas seguido de lavado y secado al aire.

15 La rugosidad de la superficie de la membrana ( $d_{\text{rugosidad}}$ ) se calcula de acuerdo con la siguiente (Ecuación 2) usando el microscopio de fuerza atómica (AFM) anterior en base a la altura de los puntos respectivos en la dirección del eje z.

$$d_{\text{rugosidad}} = \sum_{n=1}^N \frac{|Z_n - \bar{Z}|}{N} \quad (\text{Ecuación 2})$$

25  $d_{\text{rugosidad}}$ : Rugosidad superficial (μm)

$Z_n$ : Altura en la dirección del eje z (μm)

$\bar{Z}$ : Altura media en el área explorada (μm)

N: Número de muestras medidas

30 La membrana porosa usada en la presente invención puede ser una membrana plana o una membrana de fibras huecas. En casos en los que la membrana porosa es una membrana plana, su espesor medio se selecciona dependiendo del uso de la misma, y es preferiblemente de un mínimo de 20 μm y un máximo de 5.000 μm, más preferiblemente un mínimo de 50 μm y un máximo de 2.000 μm. En casos en los que la membrana porosa es una membrana de fibras huecas, el diámetro interno de la fibra hueca es preferiblemente de un mínimo de 200 μm y un máximo de 5.000 μm, y el espesor de la membrana es preferiblemente de un mínimo de 20 μm y un máximo de 2000 μm. En la fibra hueca puede estar contenida una tela o un tejido producido formando una fibra orgánica o una fibra inorgánica en una forma cilíndrica.

40 A continuación, el procedimiento para producir la membrana porosa usada en la presente invención se describirá a modo de ejemplos.

45 En primer lugar, a continuación se describirá un procedimiento para preparar una membrana plana que es una realización preferida de la membrana porosa. En la superficie de un material de base porosa, se forma un revestimiento de una solución de partida que contiene una resina y un disolvente, al mismo tiempo que se impregna la solución de partida en el material de base porosa. A partir de entonces, únicamente la superficie revestida del material de base porosa que tiene el revestimiento se pone en contacto con un baño de coagulación que contiene un producto no disolvente para coagular la resina, formando al mismo tiempo una capa de resina porosa sobre la superficie del material de base porosa.

50 La solución de partida se ajusta disolviendo una resina en un disolvente. Normalmente, la temperatura de la solución de partida se selecciona preferiblemente dentro del intervalo de 5 °C a 120 °C en vista de la propiedad de formación de película. El disolvente disuelve la resina y actúa sobre la resina para promover la formación de una capa de resina porosa por la resina. Los ejemplos del disolvente que pueden usarse incluyen N-metilpirrolidinona (NMP), N,N-dimetilacetamida (DMAc), N,N-dimetilformamida (DMF), dimetilsulfóxido (DMSO), N-metil-2-pirrolidona, metil etil cetona, tetrahydrofurano, tetrametilurea, trimetilfosfato, ciclohexanona, isoforona, γ-butirolactona, metil isoamil cetona, ftalato de dimetilo, propilenglicol metil éter, carbonato de propileno, diacetona alcohol, triacetato de glicerol, acetona y metil etil cetona. Entre estos, puede usarse preferiblemente N-metilpirrolidinona (NMP), N,N-dimetilacetamida (DMAc), N,N-dimetilformamida (DMF) y dimetilsulfóxido (DMSO), en

los que las resinas muestran altas solubilidades. Estos pueden usarse de forma individual o como una mezcla de 2 o más de los mismos.

5 Además, al disolvente se le puede añadir uno o más componentes distintos de un disolvente, tales como polietilenglicol, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona y/o glicerina. También puede añadirse al disolvente un producto no disolvente. Un producto no disolvente es un líquido que no disuelve una resina. El producto no disolvente tiene la acción de regular la velocidad de coagulación de una resina, regulando así el tamaño de los poros. Los ejemplos del producto no disolvente que puede usarse incluyen agua y alcoholes, tales como metanol y etanol. Entre estos, se prefieren agua y metanol como el producto no disolvente en vista del coste de los mismos. El compuesto distinto de un disolvente, y el producto no disolvente puede ser una mezcla.

10 A la solución de partida se le puede añadir un agente formador de poros. El agente formador de poros se extrae tras la inmersión en el baño de coagulación, haciendo así la capa de resina porosa. La adición de un agente formador de poros permite la regulación del tamaño de poro medio. El agente formador de poros tiene preferiblemente una alta solubilidad en el baño de coagulación. Los ejemplos del agente formador de poros incluyen sales inorgánicas, tales como cloruro cálcico y carbonato cálcico. Los ejemplos adicionales del agente formador de poros incluyen polioxialquilenos, tales como polietilenglicol y polipropilenglicol; compuestos macromoleculares solubles en agua, tales como alcohol polivinílico, polivinil butiral y ácido poliacrílico; y glicerina.

15 A continuación, se describirá el procedimiento de preparación de una membrana de fibras huecas que es una realización preferida de la membrana porosa. Puede prepararse una membrana de fibras huecas mediante la extrusión de una solución de partida que comprende una resina y un disolvente del tubo externo de una boquilla de doble tubo, extruyendo al mismo tiempo un fluido para la formación de la porción hueca del tubo interno seguido del enfriamiento y solidificación del resultante en un baño de refrigeración.

20 La solución de partida puede ajustarse disolviendo la resina que se ha mencionado en el procedimiento de preparación anterior para una membrana plana en el disolvente que se ha mencionado en el procedimiento de preparación anterior para una membrana plana a una concentración de un mínimo del 20% en peso y un máximo del 60% en peso. Como el fluido para la formación de la porción hueca puede usarse normalmente un gas o un líquido. Además, en la superficie externa de la membrana de fibras huecas obtenida, puede revestirse (laminarse) otra capa de resina porosa. La laminación puede realizarse para cambiar las propiedades de la membrana de fibras huecas, tales como la hidrofilia/hidrofobia y el tamaño de los poros, a las propiedades deseadas. La otra capa de resina porosa que se laminará puede prepararse disolviendo una resina en un disolvente seguido de poner en contacto la solución de partida resultante con un baño de coagulación que contiene un producto no disolvente para coagular la resina. Los ejemplos del material de la resina que pueden usarse preferiblemente incluyen unos similares a los del material de la membrana polimérica orgánica que se ha mencionado anteriormente. El procedimiento de la laminación no se limita, y los ejemplos del mismo incluyen inmersión de la membrana de fibras huecas en la solución de partida, y la aplicación de la solución de partida a la superficie de la membrana de fibras huecas, y después la laminación, una parte de la solución de partida adherida puede rasparse o disiparse con una raqueta de aire para ajustar la cantidad de laminación.

25 La membrana porosa usada en la presente invención puede hacerse en un elemento de la membrana de separación uniendo y sellando la porción hueca de la membrana de fibras huecas usando un miembro, tal como una resina, y colocando la resultante en un soporte.

30 La membrana porosa usada en la presente invención puede hacerse en un elemento de la membrana de separación combinándola con un soporte. Un elemento de la membrana de separación, en el que se usa una placa de soporte como el soporte y la membrana porosa usada en la presente invención se coloca en al menos un lado de la placa de soporte, es una forma preferida del elemento de la membrana de separación que tiene la membrana porosa usada en la presente invención. La colocación de las membranas porosas sobre ambos lados de la placa de soporte para aumentar la permeabilidad también es una realización preferida del elemento de la membrana de separación.

35 En el procedimiento de la presente invención para producir ácido láctico, la filtración se realiza preferiblemente con una diferencia de presión transmembrana de la membrana porosa de un mínimo de 0,1 kPa y menos de 20 kPa. En casos en los que la filtración se realiza con una diferencia de presión transmembrana de un mínimo de 20 kPa para filtrar el medio de cultivo de fermentación, es necesario un impulso para aplicar la presión y, por lo tanto, se reduce el efecto económico en la producción del ácido láctico. Además, mediante la aplicación de una diferencia de presión transmembrana superior de un mínimo de 20 kPa, la levadura poliploide usada en el cultivo de fermentación continua puede interrumpirse, lo que conduce a un descenso de la capacidad de producción de ácido láctico. Con una diferencia de presión transmembrana de menos de 0,1 kPa, la filtración toma tiempo, lo que conduce a un descenso de la velocidad de producción. Puesto que en casos en los que la diferencia de presión transmembrana, que es la presión de filtración, está dentro del intervalo de un mínimo de 0,1 a menos de 20 kPa, la diferencia de presión transmembrana puede obtenerse por la diferencia del cabezal hidráulico, de manera que no se requiera



especialmente que el interior del fermentador se mantenga presurizado y la capacidad para producir ácido láctico no disminuya. Además, puesto que no se requiere especialmente que el interior del fermentador se mantenga presurizado, es posible una realización en la que la membrana porosa se coloca en el interior del fermentador y, por lo tanto, el dispositivo de fermentación puede tener un menor tamaño, lo que es ventajoso.

5 La expresión "diferencia de presión transmembrana" en este documento se refiere a la diferencia de presión en la membrana porosa entre el lado del líquido que se procesará y el lado del líquido permeado. Cuando una operación se realiza a un caudal de procesamiento constante por área de superficie de la membrana porosa, y el líquido que se procesará se filtra a través de la membrana porosa durante mucho tiempo, los contaminantes que existen en el  
10 líquido que se procesará se adhieren a los poros en la membrana porosa y se acumulan sobre la superficie, lo que conduce a la contaminación de la membrana. Esto provoca la obstrucción de la membrana y aumenta la diferencia de presión transmembrana, lo que conduce a un descenso significativo del caudal de procesamiento y dificulta la continuación de una operación estable, de manera que la filtración se realice preferiblemente al mismo tiempo que se mide la diferencia de presión transmembrana. La diferencia de presión transmembrana puede medirse colocando  
15 manómetros en los lados del líquido que se procesará y el líquido permeado en la membrana porosa y midiendo las presiones seguido del cálculo de la diferencia de presión.

A continuación, se describirá la levadura poliploide que tiene la capacidad de producir ácido láctico usada en la presente invención. En el procedimiento de la presente invención para producir ácido láctico, el uso de una levadura poliploide que tiene la capacidad de producir ácido láctico permite, con unas simples condiciones de funcionamiento, la fermentación continua, en la que puede mantenerse de forma estable una alta productividad de ácido láctico, que es el producto de fermentación deseado, durante mucho tiempo y, por lo tanto, puede producirse de forma estable ácido láctico a un bajo coste.

25 La levadura poliploide es una levadura que tiene 2 o más conjuntos de cromosomas en la célula. La levadura poliploide es más grande que la levadura haploide que se usa generalmente en los análisis genéticos y, por lo tanto, no es probable que tenga lugar la obstrucción de una membrana porosa, de manera que es adecuada para un cultivo a largo plazo. Usando una levadura poliploide, la fuerza de cizalladura producida sobre la superficie de la membrana puede reducirse, la destrucción de la levadura se suprime, y la obstrucción de la membrana porosa  
30 también se suprime, de manera que pueda realizarse una filtración estable durante mucho tiempo y, además, puesto que es posible reutilizar la membrana, el coste puede reducirse, lo que es ventajoso. Además, incluso en casos en los que se obstruyó la membrana, puede obtenerse un mejor rendimiento de recuperación en el lavado en comparación con los casos de una levadura haploide. El número de conjuntos de cromosomas en la levadura poliploide no está limitado, y se prefiere una levadura diploide que tenga 2 conjuntos de cromosomas.

35 Los ejemplos de la levadura poliploide incluyen levaduras, tales como levaduras de panadería, levaduras de Sake, levaduras de vino y levaduras de cerveza, usadas con frecuencia en la industria de la fermentación. La levadura poliploide que se usará puede aislarse en una fuente natural o puede ser una cuyas propiedades se modificaron parcialmente por mutación o recombinación genética.

40 La levadura poliploide que tiene la capacidad de producir ácido láctico se refiere a una levadura poliploide a la que se introdujo un gen de lactato deshidrogenasa (en lo sucesivo en este documento también denominado como LDH). El procedimiento de preparación de una levadura poliploide a la que se introdujo un gen de lactato deshidrogenasa no está limitado, y la poliploidización de una levadura haploide a la que se introdujo un gen de lactato deshidrogenasa permite una simple multiplicación del número de copias del gen de lactato deshidrogenasa sin  
45 cambiar los genotipos por cromosoma, lo que conduce finalmente a una mejora de la capacidad de producción de ácido láctico.

Además, en la presente invención, si la levadura poliploide que tiene la capacidad de producir ácido láctico es protótrofa, puede emplearse un medio de cultivo que contiene menos nutrientes que el medio convencional, es decir, un medio de cultivo de bajo coste, y es posible una fermentación continua que permite el mantenimiento estable de una alta productividad de ácido láctico durante mucho tiempo con unas simples condiciones de funcionamiento, permitiendo la producción de bajo coste y estable de ácido láctico, por lo que se usa preferiblemente una levadura protótrofa en la presente invención.

55 La auxotrofia de una levadura significa que tendrá lugar una mutación en un gen de síntesis de nutrientes en la levadura de tipo natural, dando resultado una deficiencia de la capacidad de síntesis de una nutrición. La reversión de la auxotrofia significa la reversión de la mutación auxótrofa al tipo natural o un estado muy similar al mismo. Puesto que la auxotrofia se usa como un marcador para principalmente la manipulación genética y similares, se usa preferiblemente una levadura auxótrofa para la manipulación genética.

Los ejemplos de nutrientes conocidos necesarios para una levadura que muestra auxotrofia incluyen metionina, tirosina, isoleucina, fenilalanina, ácido glutámico, treonina, ácido aspártico, valina, serina, arginina, uracilo, adenina,

lisina, triptófano, leucina e histidina. Los ejemplos de genotipos en una levadura que muestra auxotrofia incluyen los siguientes:

- 5 auxótrofo de metionina: met1, met2, met3, met4, met5, met6, met7, met8, met10, met13, met14, met20;  
 auxótrofo de tirosina: tyr1;  
 auxótrofo de isoleucina-valina: ilv1, ilv2, ilv3, ilv5;  
 auxótrofo de fenilalanina: pha2;  
 auxótrofo de ácido glutámico: GLU3;  
 10 auxótrofo de treonina: thr1, thr4;  
 auxótrofo de ácido aspártico: asp1, asp5;  
 auxótrofo de serina: ser1, ser2;  
 auxótrofo de arginina: arg1, arg3, arg4, arg5, arg8, arg9, arg80, arg81, arg82, arg84;  
 auxótrofo de uracilo: ura1, ura2, ura3, ura4, ura6;  
 15 auxótrofo de adenina: ade1, ade2, ade3, ade4, ade5, ade6, ade8, ade9, ade12, ADE 15;  
 auxótrofo de lisina: lys1, lys2, lys4, lys5, lys7, lys9, lys11, lys13, lys14;  
 auxótrofo de triptófano: trp1, trp2, trp3, trp4, trp5;  
 auxótrofo de leucina: leu1, leu2, leu3, leu4, leu5; y  
 auxótrofo de histidina: his1, his2, his3, his4, his5, his6, his7, his8.

20 La levadura protótrofa usada preferiblemente en la presente invención es una levadura que no tiene un genotipo que muestra las auxotrofias que se han descrito anteriormente o una levadura en la que se complementa un genotipo de este tipo. Si la levadura es o no protótrofa puede determinarse en base a si la levadura puede o no crecer en un medio SD (Tabla 1) que es un medio mínimo para una levadura.

25

[Tabla 1]	
NITRÓGENO DE LEVADURA SIN AA (fabricado por Difco)	1,7 g
Glucosa	30 g
Agar	20 g
hasta 1 l	

30 Los ejemplos del procedimiento para preparar una levadura protótrofa por reversión de la auxotrofia en una levadura auxótrofa incluyen un procedimiento en el que un gen de síntesis de nutrientes se introduce mediante una técnica de recombinación génica para permitir la reversión de la auxotrofia, y un procedimiento en el que el procedimiento, en el que las levaduras que tienen diferentes auxotrofias se emparejan entre sí y se permite que tenga lugar la formación de ascus, permitiendo así la reversión de una auxotrofia de interés, se repite hasta la finalización de la reversión de todas las auxotrofias, para obtener una levadura protótrofa.

35 El LDH introducido en la levadura poliploide que tiene la capacidad de producir ácido láctico no se limita siempre que codifique una proteína que tenga la actividad de convertir el dinucleótido de nicotinamida adenina reducida (NADH) y ácido pirúvico en un dinucleótido de nicotinamida adenina oxidado (NAD+) y ácido láctico, y los ejemplos del LDH disponible incluyen LDH obtenidos a partir de bacterias de ácido láctico que tienen altos rendimientos de ácido láctico con respecto a los sacáridos y LDH obtenidos a partir de mamíferos y LDH obtenidos a partir de anfibios. Entre estos, se usan preferiblemente LDH obtenidos a partir de *Homo sapiens* y ranas. Entre las ranas, se usan preferiblemente LDH obtenidos a partir de ranas que pertenecen a las Pipidae, y entre las ranas que pertenecen a las Pipidae, pueden usarse preferiblemente LDH obtenidos a partir de *Xenopus laevis*.

40 Los LDH incluyen genes que tienen polimorfismos genéticos y genes del tipo mutante producidos por mutagénesis o similares. Aquí, "polimorfismo genético" significa que una parte de la secuencia base de un gen cambia debido a una mutación o mutaciones genéticas en el gen, y "mutagénesis" significa que una mutación o mutaciones se introducen de forma artificial en un gen. Los ejemplos del procedimiento de mutagénesis incluyen un procedimiento que usa un kit de mutagénesis de sitio dirigido (Mutan-K (TAKARA BIO INC.)) y un procedimiento que usa un kit de mutagénesis aleatoria (BD Diversify PCR Random Mutagenesis (CLONTECH)). El LDH usado en la presente invención puede tener una o más deleciones y/o una o más inserciones en una parte de su secuencia base siempre que codifique una proteína que tiene la actividad de convertir NADH y ácido pirúvico en NAD+ y ácido láctico.

50 En la levadura poliploide que tiene la capacidad de producir ácido láctico, el LDH puede retenerse en un plásmido o YAC mantenido fuera de los cromosomas de la levadura, pero como se ha mencionado anteriormente, se incorpora preferiblemente en un cromosoma de levadura y se retiene en el mismo. El procedimiento de incorporación de un LDH en un cromosoma de levadura no está limitado y, por ejemplo, puede introducirse por un procedimiento desvelado en el documento JP 2008-29329 A. En la levadura poliploide que tiene la capacidad de producir ácido láctico se retienen al menos uno, preferiblemente un mínimo de dos, más preferiblemente un mínimo de tres, aún más preferiblemente un mínimo de 4 LDH.

La materia prima de fermentación usada en la presente invención puede ser cualquier materia prima de fermentación siempre que promueva el crecimiento de la levadura que se cultivará y permita la producción satisfactoria de ácido láctico como el producto de fermentación deseado, y los ejemplos de las mismas que se usan preferiblemente incluyen medios líquidos que contienen fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno, sales inorgánicas y, si es necesario, micronutrientes orgánicos, tales como aminoácidos y vitaminas, según sea apropiado. Los ejemplos de las fuentes de carbono que se usan preferiblemente incluyen sacáridos, tales como glucosa, sacarosa, fructosa, galactosa, lactosa y maltosa; soluciones de almidón sacarificado que contienen estos sacáridos; melazas de batata; melazas de remolacha azucarera; melazas de prueba alta; zumos de caña; extractos y líquidos concentrados de zumos de caña; azúcares en bruto purificados o cristalizados en zumos de caña; azúcares refinados o cristalizados en zumos de caña; y adicionalmente, ácidos orgánicos, tales como ácido acético y ácido fumárico; alcoholes, tales como etanol; y glicerina. Aquí, el término "sacárido" se refiere al primer producto de oxidación de un poliol, que es un hidrato de carbono que tiene un grupo aldehído o un grupo cetona, y uno que tiene un grupo aldehído se clasifica como aldosa, y uno que tiene un grupo cetona se clasifica como cetosa. Es preferiblemente glucosa, sacarosa, fructosa, galactosa, lactosa o maltosa. La fuente de carbono puede añadirse al mismo tiempo cuando el cultivo se inicia o puede añadirse de forma intermitente o continua durante el cultivo.

Los ejemplos de la fuente de nitrógeno usados incluyen gas amoníaco, amoníaco acuoso, sales de amonio, urea y sales de ácido nítrico; y otras fuentes de nitrógeno orgánico usadas de forma complementaria, tales como torta de aceite, líquidos hidrolizados de soja, digestos de caseína, otros aminoácidos, vitaminas, licores de maíz fermentado, levaduras o extractos de levadura, extractos de carne, péptidos, tales como peptonas, y diversos microorganismos de fermentación e hidrolizados de los mismos.

Los ejemplos de la sal inorgánica que puede añadirse según sea apropiado incluyen sal del ácido fosfórico, sal de magnesio, sal cálcica, sal de hierro y sal de manganeso.

En casos en los que la levadura poliploide que tiene la capacidad de producir ácido láctico es auxótrofa, el nutriente puede añadirse en forma de una preparación o un producto natural que lo contiene. También puede añadirse, según sea necesario, un agente anti-formador.

Las condiciones del cultivo de fermentación de la levadura poliploide que tiene la capacidad de producir ácido láctico no están limitadas siempre que la levadura pueda cultivarse, y se realiza preferiblemente a un pH de 4 a 8 y una temperatura de 20 °C a 40 °C. El pH del medio de cultivo de fermentación se ajusta a un valor predeterminado dentro del intervalo que se ha descrito anteriormente con un ácido inorgánico o un ácido orgánico; una sustancia alcalina; urea; carbonato cálcico; o gas amoníaco.

Durante el cultivo de fermentación de la levadura poliploide que tiene la capacidad de producir ácido láctico, si se requiere que la velocidad de alimentación de oxígeno aumente, puede emplearse un procedimiento en el que la concentración de oxígeno se mantenga a un mínimo del 21% añadiendo oxígeno en el aire; la presión del medio de cultivo aumenta; la velocidad de agitación aumenta; o el volumen de ventilación aumenta. Por otro lado, si se requiere que la velocidad de alimentación de oxígeno disminuya, un gas que no contenga oxígeno, tal como gas dióxido de carbono, nitrógeno o argón puede mezclarse con el aire y suministrarse.

En la presente invención, la fermentación discontinua o la fermentación discontinua alimentada puede realizarse en la fase inicial del cultivo para aumentar la concentración celular de la levadura seguido del inicio del cultivo continuo (retirada), o las células de levadura pueden sembrarse a un alta concentración y someterse al cultivo continuo al comienzo del cultivo. Es posible iniciar el suministro del líquido de materia prima de fermentación y la retirada del cultivo en el momento apropiado. El momento del inicio del suministro del líquido de materia prima de fermentación y el momento de inicio de la retirada del cultivo no son necesariamente el mismo. El suministro del líquido de materia prima de fermentación y la retirada del cultivo puede realizarse de forma continua o intermitente. Los nutrientes que se han descrito anteriormente necesarios para el crecimiento de las células de levadura pueden añadirse al líquido de materia prima de fermentación para permitir el crecimiento continuo de las células de levadura.

La concentración de las células de levadura en el medio de cultivo de fermentación se mantiene preferiblemente alta dentro del intervalo que no provoque la muerte de las células de levadura en una tasa elevada debido a un entorno del medio de cultivo de fermentación que es inapropiado para el crecimiento de las células de levadura, en vista de conseguir una producción eficaz. Por ejemplo, manteniendo la concentración de las células de levadura en un mínimo de 5 g/l en cuando al peso en seco, puede obtenerse una buena eficiencia de producción. Siempre y cuando no se induzca un problema operativo de un dispositivo de fermentación continua o una disminución en la eficiencia de producción, no se limita el límite superior de la concentración de las células de levadura.

El funcionamiento del cultivo continuo permitiendo el crecimiento de células de levadura fresca que tienen una capacidad de producción de fermentación, se realiza preferiblemente normalmente en un solo recipiente de reacción

de fermentación en vista del control del cultivo. Sin embargo, el número de recipientes de reacción de fermentación no está limitado siempre que el cultivo continuo se realice para producir el producto permitiendo al mismo tiempo el recipiente de células de levadura. Puede usarse una pluralidad de recipientes de reacción de fermentación, por ejemplo, debido al pequeño volumen de cada recipiente de reacción de fermentación. En este caso, puede obtenerse una alta productividad del producto de fermentación incluso por cultivo continuo usando una pluralidad de recipientes de reacción de fermentación conectados en paralelo o en serie a través de tubos.

En la presente invención, "continuación de la fermentación continua" se refiere a un estado en el que el suministro del líquido de materia prima de fermentación y la retirada del cultivo se realizan continua o indirectamente. En la presente invención, se produce preferiblemente de forma eficaz ácido láctico durante el periodo en el que continúa la fermentación continua. "Producción eficiente de ácido láctico" se refiere a un estado en el que se evaluaron la concentración de ácido láctico acumulado, la velocidad de producción de ácido láctico, y el rendimiento del ácido láctico con respecto a los sacáridos, y uno, preferiblemente dos, más preferiblemente cada uno de estos es alto.

"La concentración de ácido láctico acumulado" se refiere a la concentración de ácido láctico contenido en el cultivo, y "un estado en el que la concentración de ácido láctico acumulado es alta" se refiere a un estado en el que la concentración de ácido láctico acumulado es de un mínimo de 40 g/l, y la concentración de ácido láctico acumulado es preferiblemente 42 g/l, más preferiblemente 44 g/l.

"La velocidad de producción de ácido láctico" se refiere a la cantidad de ácido láctico producido por unidad de tiempo, y "un estado en el que la velocidad de producción de ácido láctico es alta" se refiere a un estado en el que la velocidad de producción de ácido láctico representada por la Ecuación 3 es de un mínimo de 7,5 g/l/h, preferiblemente de un mínimo de 8, más preferiblemente de un mínimo de 9 g/l/h.

$P_B$ : Velocidad de producción de ácido láctico (g/l/h)

$$P_B = V \frac{dP}{dt} = \frac{P(F_M + F_N)}{V} \quad (\text{Ecuación 3})$$

$F_M$ : Velocidad de alimentación del medio de cultivo (l/h)

$F_N$ : Velocidad de alimentación del agente neutralizante (l/h)

P: Concentración del producto (g/l)

$P_B$ : Velocidad de producción (g/l/h)

S: Concentración del sustrato (g/l)

$S_R$ : Concentración del sustrato en el medio de cultivo que se suministrará (g/l)

t: Tiempo (h)

V: Cantidad de cultivo (l)

$Y_{P/S}$ : Rendimiento del producto (g/g)

"El rendimiento del ácido láctico con respecto a los sacáridos" se refiere a la proporción de ácido láctico producido a partir de una fuente de carbono consumida por unidad de tiempo, y "un estado en el que el rendimiento del ácido láctico con respecto a los sacáridos es alto" es un estado en el que el rendimiento del ácido láctico con respecto a los sacáridos representado por la Ecuación 4 es de un mínimo del 70%, preferiblemente de un mínimo del 75%, más preferiblemente de un mínimo del 80%.

$Y_{P/S}$ : Rendimiento del producto (g/g)

$$Y_{P/S} = V \frac{P}{S_R - S} = \frac{P(F_M + F_N)}{F_N S_R - S(F_M + F_N)} \quad (\text{Ecuación 4})$$

Los pesos de todos los sacáridos en el medio de cultivo se convierten en la masa de glucosa.

Ejemplo: 1 mol de sacarosa se convierte en 2 mol de glucosa.

La separación y la purificación del ácido láctico contenido en el líquido de fermentación filtrado/separado producido por la presente invención puede realizarse por una combinación de procedimientos conocidos convencionalmente para la concentración, destilación, cristalización y similares, y los ejemplos de los procedimientos incluyen un procedimiento en el que el pH del líquido de fermentación filtrado/separado se ajusta a un máximo de 1 seguido de la extracción con éter dietílico, acetato de etilo o similares, un procedimiento en el que se deja que el ácido láctico absorba una resina de intercambio iónico seguido de lavado y elución, un procedimiento en el que el ácido láctico se

deja reaccionar con un alcohol en presencia de un catalizador ácido para producir un éster, que después se somete a destilación, un procedimiento en el que el ácido láctico se cristaliza como la sal cálcica o la sal de litio, y un procedimiento de separación/purificación en el que el nanofiltro desvelado en el documento WO2009/004922 se combina con destilación.

5 A continuación, se describirán realizaciones preferidas del dispositivo de fermentación continua usado en el procedimiento de la presente invención para producir ácido láctico haciendo referencia a los dibujos.

10 La figura 1 es una vista lateral esquemática para la explicación de un ejemplo preferido del dispositivo de fermentación continua del tipo separación por membrana usado en el procedimiento de la presente invención para producir ácido láctico por fermentación continua. La figura 1 es un ejemplo representativo del dispositivo en el que el elemento de la membrana de separación se coloca fuera del recipiente de reacción de fermentación.

15 En la figura 1, el dispositivo de fermentación continua del tipo separación por membrana está constituido básicamente por un recipiente de reacción de fermentación 1, una capa de separación por membrana 12 y un aparato de control de la diferencia de presión 3. Aquí, en el elemento de la membrana de separación 2, se incorpora una membrana de separación porosa. Los ejemplos preferidos de la membrana de separación porosa empleada incluyen la membrana de separación y el elemento de la membrana de separación desvelados en el documento WO 2002/064240. El recipiente de separación por membrana 12 está conectado a un recipiente de  
20 reacción de fermentación 1 a través de una bomba circulante del medio de cultivo de fermentación 11.

25 En la figura 1, puede suministrarse un medio de cultivo al recipiente de reacción de fermentación 1 por una bomba de suministro del medio de cultivo 7, y, según se requiera, el medio de cultivo de fermentación en el recipiente de reacción de fermentación 1 puede agitarse por un agitador 5 y, adicionalmente, según se requiera, puede suministrarse un gas necesario mediante un aparato de suministro de gas 4. El gas suministrado puede recuperarse y reciclarse, seguido del suministro de nuevo con el aparato de suministro de gas 4. Además, según se requiera, el pH del líquido de fermentación puede ajustarse por un aparato de control del detector de pH 9 y una bomba de suministro de una solución de ajuste del pH 8 y, adicionalmente, según se requiera, la temperatura del medio de cultivo de fermentación puede ajustarse mediante un controlador de temperatura 10, para realizar una producción de  
30 fermentación altamente productiva. El líquido de fermentación en el dispositivo circula entre el recipiente de reacción de fermentación 1 y el recipiente de separación por membrana 12 por la bomba circulante de líquido de fermentación 11. El medio de cultivo de fermentación que contiene un producto de fermentación se filtra y se separa por el elemento de la membrana de separación 2 en el microorganismo y el producto de fermentación, que puede recuperarse en el sistema del dispositivo.

35 La concentración de los microorganismos en el sistema del dispositivo puede mantenerse alta permitiendo que los microorganismos, que se filtraron y se separaron, permanezcan en el sistema del dispositivo, permitiendo así una producción de fermentación altamente productiva. Aquí, la filtración y la separación por el elemento de la membrana de separación 2 puede realizarse por la diferencia de presión del cabezal hidráulico a partir del nivel de fluido en el  
40 recipiente de separación por membrana 12 sin usar una potencia particular, pero, según se requiera, la velocidad de filtración/separación del elemento de la membrana de separación 2 y la cantidad del medio de cultivo de fermentación en el sistema del dispositivo pueden controlarse apropiadamente por un detector de nivel 6 y el aparato de control de la diferencia de presión 3. Según se requiera, puede suministrarse un gas necesario por el aparato de suministro de gas 4 en el recipiente de separación por membrana 12. El gas suministrado puede recuperarse y reciclarse, seguido de su suministro de nuevo con el aparato de suministro de gas 4. La filtración y la separación por  
45 el elemento de la membrana de separación 2 también puede realizarse, según se requiera, por filtración por succión con una bomba, o similares, o por presurización del interior del sistema del dispositivo. La levadura poliploide puede cultivarse en un recipiente de cultivo por fermentación continua y puede suministrarse al recipiente de fermentación según se requiera. Cultivando la levadura poliploide en un recipiente de cultivo y suministrándola en el recipiente de  
50 fermentación según sea necesario, la fermentación continua puede realizarse constantemente con levadura poliploide fresca altamente capaz de producir ácido láctico, y la fermentación continua puede continuar durante mucho tiempo con un alto rendimiento productivo.

55 La figura 2 es una vista lateral esquemática para la explicación de otro ejemplo del dispositivo de fermentación continua del tipo separación por membrana usado en la presente invención. Entre los dispositivos de fermentación continua usados en el procedimiento de la presente invención para producir ácido láctico, un ejemplo representativo, en el que el elemento de la membrana de separación se coloca en el interior del recipiente de reacción de fermentación, se muestra en la vista esquemática de la figura 2.

60 En la figura 2, el dispositivo de fermentación continua del tipo separación por membrana está constituido básicamente por un recipiente de reacción de fermentación 1 y un aparato de control de la diferencia de presión 3. En el elemento de la membrana de separación 2 en el recipiente de reacción de fermentación 1, se incorpora una membrana porosa. Los ejemplos de esta membrana de separación porosa que pueden emplearse incluyen la

membrana de separación y el elemento de la membrana de separación desvelados en el documento WO 2002/064240. A continuación, se describirán detalles de este elemento de la membrana de separación.

5 A continuación, se explicará la realización de la fermentación continua por el dispositivo de fermentación continua del tipo separación por membrana en la figura 2. Mediante una bomba de suministro del medio de cultivo 7, se suministra de forma continua o intermitente un medio de cultivo al recipiente de reacción de fermentación 1. El medio de cultivo puede someterse a desinfección térmica o esterilización térmica, o a un tratamiento de esterilización usando un filtro antes del suministro, según sea necesario. Durante la producción de fermentación, según sea necesario, el medio de cultivo de fermentación en el recipiente de reacción de fermentación 1 se agita mediante un  
10 agitador 5 en el recipiente de reacción de fermentación 1. Durante la producción de fermentación, según sea necesario, puede suministrarse un gas necesario en el recipiente de reacción de fermentación 1 mediante un aparato de suministro de gas 4. Durante la producción de fermentación, según sea necesario, el pH del medio de cultivo de fermentación en el recipiente de reacción de fermentación 1 puede controlarse por un aparato de control del detector de pH 9 y una bomba de suministro de una solución de ajuste del pH 8 y, según sea necesario, la  
15 temperatura del medio de cultivo de fermentación en el recipiente de reacción de fermentación 1 puede controlarse mediante un controlador de temperatura 10, para realizar una producción de fermentación altamente productiva. Aquí, el pH y la temperatura se mostraron como ejemplos de las condiciones fisicoquímicas del medio de cultivo de fermentación a controlar por aparatos de instrumentación/control, pero, según sea necesario, puede controlarse el oxígeno disuelto y/o el ORP, y mediante un aparato de análisis, tal como un detector químico en línea, puede medirse la concentración de ácido láctico en el medio de cultivo de fermentación seguido del control de las condiciones fisicoquímicas usando como un índice la concentración de ácido láctico en el medio de cultivo de fermentación. Cuando se realiza el suministro continuo o intermitente del medio de cultivo, la cantidad del medio de cultivo que se suministrará y la velocidad de suministro del mismo se controlan apropiadamente usando como un índice el valor medido del entorno fisicoquímico del líquido de fermentación por el aparato de instrumentación.

25 En la figura 2, en cuanto al medio de cultivo de fermentación, las células de levadura y el producto de fermentación se filtran y se separan por un elemento de la membrana de separación 2 colocado en el recipiente de reacción de fermentación 1, y el producto de fermentación se recupera del sistema del dispositivo. La concentración de la levadura en el sistema del dispositivo puede mantenerse alta permitiendo que la levadura, que se filtró y se separó, permanezca en el sistema del dispositivo, permitiendo así una producción de fermentación altamente productiva. Aquí, la filtración y la separación por el elemento de la membrana de separación 2 puede realizarse por la diferencia de presión del cabezal hidráulico a partir del nivel de fluido en el recipiente de reacción de fermentación 1 sin usar una potencia particular, pero, según se requiera, la velocidad de filtración/separación del elemento de la membrana de separación 2 y la cantidad del medio de cultivo de fermentación en el recipiente de reacción de fermentación 1 pueden controlarse apropiadamente por un detector de nivel 6 y el aparato de control de la diferencia de presión 3.

40 La filtración y la separación por el elemento de la membrana de separación que se ha descrito anteriormente también puede realizarse, según sea necesario, por filtración por succión con una bomba, o similares, o por presurización del interior del sistema del dispositivo. Las células de levadura pueden cultivarse en un recipiente de cultivo preparado por separado y suministradas al recipiente de fermentación según sea necesario. Cultivando las células de levadura en un recipiente de cultivo y suministrándolas al recipiente de fermentación según sea necesario, la fermentación continua puede realizarse constantemente con células de levadura fresca, y la fermentación continua puede continuar durante mucho tiempo con un alto rendimiento productivo.

45 El elemento de la membrana de separación usado preferiblemente en el dispositivo de fermentación continua usado en el procedimiento de la presente invención para producir ácido láctico se describirá ahora haciendo referencia a los dibujos. En el dispositivo de fermentación continua usado en el procedimiento de la presente invención para producir ácido láctico, pueden usarse preferiblemente la membrana de separación y el elemento de la membrana de separación desvelados en el documento WO 2002/064240.

50 En cuanto a la realización del elemento de la membrana de separación usado en la presente invención, a continuación se resumirán la membrana de separación y el elemento de la membrana de separación desvelados en el documento WO 2002/064240 como ejemplos de realizaciones preferidas haciendo referencia al dibujo. La figura 3 es una vista en perspectiva esquemática para la explicación de una realización del elemento de membrana de separación usado en la presente invención.

55 El elemento de la membrana de separación está constituido, como se muestra en la figura 3, por un material de canal 14 y la membrana de separación 15 dispuestos en este orden en cada uno de ambos lados de una placa de soporte 13 que tiene rigidez. La placa de soporte 13 tiene una concavidad 16 en cada uno de ambos lados. El medio de cultivo de fermentación se filtra a través de la membrana de separación 15. El material de canal 14 se usa para permitir un flujo eficaz del líquido permeado, que se filtró a través de la membrana de separación 15, a la placa de soporte 13. El líquido permeado que se dejó fluir a la placa de soporte 13 después se desplaza a través de las  
60

concauidades 16 en la placa de soporte 13, y después se recupera en el exterior del dispositivo de fermentación continua a través de una tubería de recolección de líquido 17, que es un medio de descarga.

5 A continuación, se describirá otra realización del elemento de la membrana de separación mostrado en la figura 4. La figura 4 es una vista en sección transversal para explicar el otro ejemplo del elemento de la membrana de separación usado en la presente invención.

10 En cuanto al elemento de la membrana de separación, como se muestra en la figura 4, un manojito de membranas de separación 18 constituido por membranas de fibras huecas, se adhiere e inmoviliza en forma de manojito por una capa de sellado de resina superior 19 y una capa de sellado de resina inferior 20. Por la adherencia e inmovilización por la capa de sellado de resina inferior 20, la porción hueca de la membrana de fibras huecas se cierra herméticamente para proporcionar una estructura que impide la fuga del medio de cultivo de fermentación. Por otro lado, la capa de sellado de resina superior 19 no sella el poro interno de la membrana de fibras huecas, con el fin de proporcionar una estructura que permita que el líquido permeado fluya a través de una tubería de recolección de líquido 22. Este elemento de la membrana de separación puede colocarse en el dispositivo de fermentación continua a través de un marco de soporte 21. El líquido permeado filtrado por el manojito de membranas de separación 18 fluye a través de la porción hueca de la membrana de fibras huecas y se recupera en el exterior del recipiente del cultivo de fermentación a través de la tubería de recolección de líquido 22. Como el impulso para recuperar el líquido permeado, puede usarse filtración por succión por la diferencia de presión del cabezal hidráulico o una bomba, líquido, gas o similar, o un procedimiento para presurizar el interior del sistema del dispositivo, o similar.

25 Los miembros que constituyen el elemento de la membrana de separación del dispositivo de fermentación continua usado en el procedimiento de la presente invención para producir ácido láctico por fermentación continua son preferiblemente resistentes al autoclavado. Si el interior del dispositivo de fermentación puede esterizarse, puede evitarse el riesgo de contaminación con cuerpos fúngicos desfavorables, y es posible una fermentación continua más estable. Los miembros que constituyen al elemento de la membrana de separación son preferiblemente resistentes a un tratamiento a una temperatura de 121 °C durante 15 minutos, que son las condiciones de autoclavado. Los ejemplos de los miembros del elemento de la membrana de separación que pueden seleccionarse preferiblemente incluyen metales tales como acero inoxidable y aluminio; y resinas tales como resinas de poliamida, resinas de fluorocarbono, resinas de policarbonato, resinas de poliacetil, resinas de tereftalato de polibutileno, PVDF, resinas de éter de polifenileno modificado y resinas de polisulfona.

35 En el dispositivo de fermentación continua usado en el procedimiento de la presente invención para producir ácido láctico por fermentación continua, el elemento de la membrana de separación puede colocarse fuera del recipiente de fermentación o dentro del recipiente de reacción de fermentación. En casos en los que el elemento de la membrana de separación se coloca fuera del recipiente de reacción de fermentación, puede proporcionarse por separado un recipiente de separación por membrana para colocar el elemento de la membrana de separación en el mismo, y el medio de cultivo de fermentación puede filtrarse continuamente por el elemento de la membrana de separación evitando al mismo tiempo que el medio de cultivo de fermentación circule entre el recipiente de reacción de fermentación y el recipiente de separación por membrana.

40 En el dispositivo de fermentación continua usado en el procedimiento de la presente invención para producir ácido láctico por fermentación continua, el recipiente de separación por membrana es preferiblemente autoclavable. Haciendo que el recipiente de separación por membrana sea autoclavable, puede evitarse fácilmente la contaminación.

## EJEMPLOS

50 La presente invención se describirá ahora a modo de Ejemplos.

(Ejemplo de Referencia 1)

Preparación de Levadura Poliploide que Tiene la Capacidad de Producir Ácido Láctico

55 Se preparó una levadura poliploide que tenía la capacidad de producir ácido láctico mediante poliploidización de una levadura que tenía la capacidad de producir ácido láctico obtenido por la introducción del gen L-lactato deshidrogenasa obtenido a partir de *Xenopus laevis* (en lo sucesivo en este documento también denominado como "XLDH") a la cepa NBRC 10505 de *Saccharomyces cerevisiae*. Además, como se describirá a continuación en detalle, se dio una reversión de la auxotrofia y/o una mutación sensible a la temperatura para la levadura poliploide resultante. Las cepas de levadura usadas para la preparación de levadura poliploide y las cepas de levadura preparadas mediante el procedimiento que se describe a continuación se muestran en la figura 2. A continuación, se describirán en detalle procedimientos para los procedimientos de la inserción del LDH, la entrega de la mutación sensible a la temperatura y la reversión de la auxotrofia.

(Parte 1)

Construcción del Vector para la Expresión de L-LDH (XLDH) Obtenido a partir de *Xenopus laevis*

5 La clonación de XLDH (SEQ ID NO: 1) se realizó mediante análisis por PCR. Para el análisis por PCR, se usó un ADN fagémido preparado a partir de una biblioteca de ADNc (fabricada por STRATAGENE) obtenida a partir de riñón de *Xenopus laevis* de acuerdo con el protocolo del fabricante como patrón.

10 Para la reacción de amplificación por PCR, se usó polimerasa KOD-Plus (fabricada por Toyobo Co., Ltd.), y se usaron el tampón de reacción, la mezcla de dNTP y similares, incluidos en la misma. El ADN fagémido ajustado de acuerdo con el protocolo del fabricante como se ha descrito anteriormente se usó para preparar 50 µl de un sistema de reacción que contenía 50 ng/muestra del ADN fagémido, 50 µmol/muestra de cebadores y 1 U/muestra de polimerasa KOD-Plus. La solución de reacción se sometió a desnaturalización mediante un dispositivo de amplificación por iCycler (fabricado por BIO-RAD) a una temperatura de 94 °C durante 5 minutos seguido de 30 ciclos de: 94 °C (desnaturalización térmica) durante 30 segundos, 55 °C (atemperado de los cebadores) durante 30 segundos y 68 °C (extensión de la cepa complementaria) durante 1 minuto. A partir de entonces, la solución de reacción se enfrió a una temperatura de 4 °C. Los cebadores (SEQ ID NO: 2 y 3) para la amplificación del gen se prepararon de tal forma que la secuencia de reconocimiento de *Sall* y la secuencia de reconocimiento de *NotI* se añadieran al extremo 5' y el extremo 3', respectivamente.

25 El fragmento de amplificación por PCR se purificó y se fosforiló mediante T4 polinucleótido-cinasa (fabricado por TAKARA BIO INC.) en sus extremos, y se ligó al vector pUC 118 (que se había digerido preliminarmente con una enzima de restricción *HindIII* y los extremos digeridos se habían sometido a un tratamiento de desfosforilación). La ligación se realizó usando un kit de ligación de ADN (DNA Ligation Kit Ver. 2) (fabricado por TAKARA BIO INC.). Las células competentes de *E. coli* DH5α (fabricados por TAKARA BIO INC.) se transformaron con la solución de ligación y se colocaron en una placa de LB que contenía 50 µg/ml de una ampicilina antibiótica seguido de cultivo durante una noche. Se recogieron ADN plasmídicos de colonias desarrolladas mediante minipreparación y se digirieron con las enzimas de restricción *Sall* y *NotI* seguido de la selección de un plásmido al que se le insertó el gen LDH obtenido a partir de *Xenopus laevis*. Esta serie de pasos se realizó en su totalidad de acuerdo con el protocolo del fabricante.

35 El vector pUC118 al que se le insertó el XLDH se digirió con las enzimas de restricción *Sall* y *NotI*, y los fragmentos de ADN se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% seguido de la purificación del fragmento que contenía XLDH de acuerdo con un procedimiento convencional. El fragmento obtenido se ligó al sitio de digestión *XhoI/NotI* en el vector de expresión pTRS11 mostrado en la figura 5, y el ADN plasmídico se recogió mediante el mismo procedimiento que se ha descrito anteriormente seguido de digestión del mismo con las enzimas de restricción *XhoI* y *NotI* y la selección de pTRS102, que es un vector de expresión al que se le insertó XLDH.

40 A continuación, se describirá el procedimiento para insertar LDH a los locus PDC1, SED1 y TDH3 usando el vector pTRS102 obtenido de este modo como patrón para XLDH.

(Parte 2)

45 Inserción de LDH al Locus PDC1 del Cromosoma de Levadura

Usando pTRS102 como patrón para la amplificación y oligonucleótidos (SEQ ID NO: 4 y 5) como conjunto de cebadores, se realizó un análisis por PCR para amplificar un fragmento de PCR de 1,3 kb que comprendía XLDH y la secuencia de terminación TDH3. Aquí, la SEQ ID NO: 4 se diseñó de tal forma que se añadió la secuencia que correspondía a la región de 60 pb en la dirección 5' inmediata del codón de inicio del gen PDC 1.

55 Posteriormente, usando el plásmido pTRS424 como patrón para la amplificación y oligonucleótidos (SEQ ID NO: 6 y 7) como conjunto de cebadores, se realizó un análisis por PCR para amplificar un fragmento de PCR de 1,2 kb que comprendía el gen TRP 1 que es el marcador de selección para la levadura. Aquí, la SEQ ID NO: 7 se diseñó de tal forma que se añadió la secuencia que correspondía a la región de 60 pb en la dirección 3' inmediata del codón de terminación del gen PDC 1.

60 Cada fragmento de ADN se separó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y se purificó de acuerdo con un procedimiento convencional. Usando una mezcla del fragmento de 1,3 kb y el fragmento de 1,2 kb obtenidos como patrón para la amplificación y oligonucleótidos (SEQ ID NO: 4 y 7) como conjunto de cebadores, se realizó un análisis por PCR para amplificar un fragmento de PCR de aproximadamente 2,5 kb en el que el XLDH, el terminador TDH3 y el gen TRP 1 se unieron, y las secuencias que correspondían a la región de 60 pb en la dirección 5'



inmediata y la región de 60 pb en la dirección 3' inmediata del gen PDC1 se añadieron al extremo 5' y el extremo 3', respectivamente.

5 El fragmento de PCR se separó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y se purificó de acuerdo con un procedimiento convencional seguido de la transformación y el cultivo en un medio de cultivo que no se suplementó con triptófano. Por esto, se seleccionó un transformante que tenía XLDH introducido en la dirección 3' del promotor del gen PDC1 en el cromosoma.

10 Para confirmar que el transformante obtenido de esta manera era una levadura que tenía el L-LDH obtenido a partir de *Xenopus laevis* introducido en la dirección 3' del promotor del gen PDC1 en el cromosoma se realizaron las siguientes operaciones. En primer lugar, el ADN genómico del transformante se preparó con un kit de extracción de ADN genómico Dr. GenTLE (fabricado por TAKARA BIO INC.), y usando el ADN genómico resultante como patrón para la amplificación y oligonucleótidos (SEQ ID NO: 7 y 8) como conjunto de cebadores, se realizó un análisis por PCR para confirmar que se amplificó un fragmento de ADN de aproximadamente 2,8 kb. Una cepa no transformada produce un fragmento de ADN de aproximadamente 2,1 kb mediante amplificación por el análisis por PCR anterior.

(Parte 3)

20 Inserción de LDH al Locus SED 1 del Cromosoma de levadura

En cuanto a la introducción en locus SED 1, usando pTRS102 preparado en el Ejemplo de Referencia 1 como patrón para la amplificación y oligonucleótidos (SEQ ID NO: 5 y 9) como conjunto de cebadores, se realizó un análisis por PCR para amplificar un fragmento de PCR de 1,3 kb que comprendía el gen LDH obtenido a partir de *Xenopus laevis* y la secuencia de terminación TDH3. Aquí, la SEQ ID NO: 9 se diseñó de tal forma que se añadió la secuencia que correspondía a la región de 60 pb en la dirección 5' inmediata del codón de inicio del gen SED 1.

25 Posteriormente, usando el plásmido pRS423 como patrón para la amplificación y oligonucleótidos (SEQ ID NO: 6 y 10) como conjunto de cebadores, se realizó un análisis por PCR para amplificar un fragmento de PCR de aproximadamente 1,3 kb que comprendía el gen HIS3, que es el marcador de selección para la levadura. Aquí, la SEQ ID NO: 10 se diseñó de tal forma que se añadió la secuencia que correspondía a la región de 60 pb en la dirección 3' inmediata del codón de terminación del gen SED1.

35 Cada fragmento de ADN se separó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y se purificó de acuerdo con un procedimiento convencional. Usando una mezcla de los dos tipos obtenidos de fragmentos que tenían longitudes de aproximadamente 1,3 kb como el patrón para la amplificación y oligonucleótidos (SEQ ID NO: 9 y 10) como conjunto de cebadores, se realizó un análisis por PCR para amplificar un fragmento de PCR de aproximadamente 2,6 kb en el que el LDH obtenido a partir de *Xenopus laevis*, la terminación TDH3 y el gen HIS3 se unieron, y las secuencias que correspondían a las regiones de 60 pb en la dirección 5' y en la dirección 3' inmediatas del gen SED1 se añadieron al extremo 5' y al extremo 3', respectivamente.

40 El fragmento de PCR se separó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y se purificó de acuerdo con un procedimiento convencional seguido de la transformación y el cultivo en un medio de cultivo que no se suplementó con histidina. Por esto, se seleccionó un transformante que tenía XLDH introducido en la dirección 3' del promotor del gen SED1 en el cromosoma.

45 Para confirmar que el transformante obtenido de esta manera era una levadura que tenía XLDH introducido en la dirección 3' del promotor del gen SED1 en el cromosoma, se realizaron las siguientes operaciones. En primer lugar, el ADN genómico del transformante se preparó con un kit de extracción de ADN genómico Dr. GenTLE (fabricado por TAKARA BIO INC.), y usando el ADN genómico resultante como patrón para la amplificación y oligonucleótidos (SEQ ID NO: 11 y 12) como conjunto de cebadores, se realizó un análisis por PCR para confirmar que se amplificó un fragmento de ADN de aproximadamente 2,9 kb. Una cepa no transformada produce un fragmento de ADN de aproximadamente 1,4 kb mediante amplificación por el análisis por PCR anterior.

(Parte 4)

55 Inserción de LDH al Locus TDH3 del Cromosoma de levadura

En cuanto a la introducción en el locus TDH3, se preparó un plásmido en el que la terminación TDH3 de pTRS102 se reemplazó por la terminación ADH 1.

60 En primer lugar, el ADN genómico se preparó a partir de la cepa NBRC10505 con un kit de extracción de ADN genómico "Dr. GenTLE" (fabricado por TAKARA BIO INC.), y usando el ADN genómico extraído como patrón y los oligonucleótidos (SEQ ID NO: 13 y 14) como conjunto de cebadores, se realizó un análisis por PCR para amplificar

un fragmento de PCR que contenía el promotor ADH1. Aquí, la SEQ ID NO: 13 estaba diseñada de tal forma que la secuencia de reconocimiento *NotI* se añadió a su extremo 5' y la SEQ ID NO: 14 estaba diseñada de tal forma que la secuencia de reconocimiento *HindIII* se añadió a su extremo 3'.

5 El fragmento de amplificación por PCR se purificó y se fosforiló por T4 polinucleótido-cinasa (fabricada por TAKARA BIO INC.) en sus extremos, y se ligó al vector pUC118 (que se había digerido preliminarmente con una enzima de restricción *HindIII* y los extremos digeridos se habían sometido a un tratamiento de desfosforilación). Las células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$  (fabricadas por TAKARA BIO INC.) se transformaron con la solución de ligación y se colocaron en una placa de LB que contenía 50  $\mu$ g/ml de una ampicilina antibiótica seguido de cultivo durante una  
10 noche. De las colonias desarrolladas, se recogieron ADN plasmídicos mediante minipreparación y se digirieron con las enzimas de restricción *NotI* y *HindIII*, seguido de la selección de un plásmido al que se le insertó la terminación ADH1. El plásmido preparado se denominará pUC 118-ADH1t.

15 Posteriormente, pUC118-ADH1t se digirió con las enzimas de restricción *NotI* y *HindIII*, y los fragmentos de ADN se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, seguido de la purificación del fragmento que contenía la terminación ADH 1 de acuerdo con un procedimiento convencional. El fragmento obtenido que contenía la terminación ADH1 se ligó al sitio de digestión *NotI/HindIII* en pTRS102, y se recogieron ADN plasmídicos por el mismo procedimiento que se ha descrito anteriormente, seguido de la digestión de los mismos con las enzimas de restricción *NotI* y *HindIII* y la selección de un plásmido en el que la terminación TDH3 se reemplazó por la terminación ADH1. El  
20 plásmido preparado de esta manera se denominará en lo sucesivo en este documento como pTRS150.

Usando este pTRS150 como patrón y oligonucleótidos (SEQ ID NO: 15 y 16) como conjunto de cebadores, se realizó un análisis por PCR para amplificar un fragmento de PCR de 1,3 kb que comprendía el gen L-LDH derivado de rana y la secuencia de terminación ADH1. Aquí, el cebador con la secuencia de SEQ ID NO: 16 se diseñó de tal  
25 forma que se añadió la secuencia que correspondía a la región de 60 pb en la dirección 5' inmediata del codón de inicio del gen TDH3.

Posteriormente, usando el plásmido pRS426 como patrón para la amplificación y oligonucleótidos (SEQ ID NO: 17 y 18) como conjunto de cebadores, se realizó un análisis por PCR para amplificar un fragmento de PCR de 1,2 kb que comprendía el gen URA3, que es el marcador de selección para la levadura. Aquí, el cebador con la secuencia de  
30 SEQ ID NO: 18 se diseñó de tal forma que se añadió la secuencia que correspondía a la región de 60 pb en la dirección 3' inmediata del codón de terminación del gen TDH3.

Cada fragmento de ADN se separó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y se purificó de acuerdo con un procedimiento convencional. Usando una mezcla del fragmento de 1,3 kb y el fragmento de 1,2 kb obtenidos como patrón para la amplificación y oligonucleótidos (SEQ ID NO: 16 y 18) como conjunto de cebadores, se realizó un  
35 análisis por PCR para amplificar un fragmento de PCR de aproximadamente 2,5 kb en el que se unieron el XLDH, la terminación ADH1 y el gen URA3.

40 El fragmento de PCR se separó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y se purificó de acuerdo con un procedimiento convencional, seguido de transformación y cultivo en un medio de cultivo que no se suplementó con uracilo. Por esto, se seleccionó un transformante que tenía XLDH introducido en la dirección 3' del promotor del gen TDH3 en el cromosoma.

45 Para confirmar que el transformante obtenido de esta manera era una levadura que tenía XLDH introducido en la dirección 3' del promotor del gen TDH3 en el cromosoma, se realizaron las siguientes operaciones. En primer lugar, el ADN genómico del transformante se preparó con un kit de extracción de ADN genómico "Dr. GentLE" (fabricado por TAKARA BIO INC.), y usando el ADN genómico resultante como patrón para la amplificación y oligonucleótidos (SEQ ID NO: 19 y 20) como conjunto de cebadores, se realizó un análisis por PCR para confirmar que se amplificó  
50 un fragmento de ADN de aproximadamente 2,8 kb. Una cepa no transformada produce un fragmento de ADN de aproximadamente 2,1 kb mediante amplificación por el análisis por PCR anterior.

(Parte 5)

55 Obtención de una Levadura que Tenía el Gen PDC5 que Poseía una Mutación Sensible a la Temperatura

Se dio una mutación sensible a la temperatura emparejando la cepa de levadura SWO15, que tenía una mutación sensible a la temperatura en el gen *pdc5* descrito en el documento JP 2008-048726 A, con la levadura a la que había de dar una mutación sensible a la temperatura. En esta levadura diploide, se permitió que tuviera lugar la  
60 formación de ascus en un medio de formación de ascus, y los asci resultantes se diseccionaron con un micromanipulador para obtener células haploides respectivas. Se analizó la auxotrofia para cada una de las células haploides para seleccionar una cepa que tenía XLDH insertado en uno del gen PDC1, el gen SED1 y el locus TDH1,

y que tenía adicionalmente una mutación sensible a la temperatura en el gen PDC5 (incapaz de crecer a 34 °C). A continuación, se describirá el procedimiento de reversión de la auxotrofia.

(Parte 6)

5

Preparación de una Cepa que Muestra Reversión de la Auxotrofia de Lisina

En los casos de reversión de la auxotrofia de lisina, se usó el siguiente procedimiento. Usando el ADN genómico de BY4741 fabricado por Funakoshi como el patrón y oligonucleótidos (SEQ ID NO: 21 y 22) como conjunto de cebadores, se realizó un análisis por PCR para amplificar un fragmento de PCR de aproximadamente 2 kb correspondiente a la mitad anterior del gen LYS2. El fragmento de PCR se separó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y se purificó de acuerdo con un procedimiento convencional, seguido de transformación para cancelar la mutación ámbar del gen LYS2. Cultivando la levadura en un medio de cultivo que no se suplementó con lisina, se seleccionó un transformante que mostraba la reversión de la capacidad de síntesis de lisina.

15

Para confirmar que el transformante obtenido de esta manera era una levadura cuya mutación ámbar del gen LYS2 se canceló, se realizaron las siguientes operaciones. En primer lugar, se obtuvieron células diploides emparejando el transformante obtenido con la cepa 20GY77 que tenía el gen LYS2 de tipo natural. En las células diploides, se permitió que tuviera lugar la formación de ascus en un medio de formación de ascus. Los asci resultantes se diseccionaron con un micromanipulador para obtener células haploides respectivas, y se analizó la auxotrofia para cada una de las células haploides. Se confirmó que todas las células haploides obtenidas tenían la capacidad de síntesis de la lisina. En casos en los que la reversión de la capacidad de síntesis de la lisina tuvo lugar sin cancelar la mutación del gen LYS2, se obtienen células que no tienen la capacidad de síntesis de lisina entre las células haploides obtenidas como anteriormente.

25

(Parte 7)

Obtención de una Cepa que Muestra la Reversión de la Auxotrofia de Leucina

En el caso de reversión de la auxotrofia de leucina, se usó el siguiente procedimiento. Usando el plásmido PRS425 como el patrón y oligonucleótidos (SEQ ID NO: 23 y 24) como conjunto de cebadores, se realizó un análisis por PCR para amplificar un fragmento de PCR de aproximadamente 2 kb del gen LEU2. El fragmento de PCR se separó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y se purificó de acuerdo con un procedimiento convencional, seguido de transformación para cancelar la mutación del gen LEU2. Cultivando la levadura en un medio de cultivo que no se suplementó con leucina, se seleccionó un transformante que mostraba la reversión de la capacidad de síntesis de leucina.

35

Para confirmar que el transformante obtenido de esta manera era una levadura cuya mutación del gen LEU2 se canceló, se realizaron las siguientes operaciones. En primer lugar, se obtuvieron células diploides emparejando el transformante obtenido con la cepa 20GY7 de *Saccharomyces cerevisiae* que tenía el gen LEU2 de tipo natural. En las células diploides, se permitió que tuviera lugar la formación de ascus en un medio de formación de ascus. Los asci resultantes se diseccionaron con un micromanipulador para obtener células haploides respectivas, y se analizó la auxotrofia para cada una de las células haploides. Se confirmó que todas las células haploides obtenidas tenían la capacidad de síntesis de leucina. En casos en los que la reversión de la capacidad de síntesis de leucina tuvo lugar sin cancelar la mutación del gen LEU2, se obtienen células que no tienen la capacidad de síntesis de leucina entre las células haploides obtenidas como anteriormente.

45

(Parte 8)

50 Obtención de la Cepa que Muestra Reversión de la Auxotrofia de Adenina

En el caso de reversión de la auxotrofia de adenina, se usó el siguiente procedimiento. Usando el plásmido PRS422 como el patrón y oligonucleótidos (SEQ ID NO: 25 y 26) como conjunto de cebadores, se realizó un análisis por PCR para amplificar un fragmento de PCR de aproximadamente 2 kb del gen ADE2. El fragmento de PCR se separó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y se purificó de acuerdo con un procedimiento convencional, seguido de transformación para cancelar la mutación del gen LEU2. Cultivando la levadura en un medio de cultivo que no se suplementó con adenina, se seleccionó un transformante que mostraba la reversión de la capacidad de síntesis de adenina leucina.

55

Para confirmar que el transformante obtenido de esta manera era una levadura cuya mutación del gen AED2 se canceló, se realizaron las siguientes operaciones. En primer lugar, se obtuvieron células diploides emparejando el transformante obtenido con la cepa 20GY7 de *Saccharomyces cerevisiae* que tenía el gen ADE2 de tipo natural. En las células diploides, se permitió que tuviera lugar la formación de ascus en un medio de formación de ascus. Los

60

asci resultantes se diseccionaron con un micromanipulador para obtener células haploides respectivas, y se analizó la auxotrofia para cada una de las células haploides. Se confirmó que todas las células haploides obtenidas tenían la capacidad de síntesis de adenina. En casos en los que la reversión de la capacidad de síntesis de adenina tuvo lugar sin cancelar la mutación del gen ADE2, se obtienen células que no tienen la capacidad de síntesis de adenina entre las células haploides obtenidas como anteriormente.

(Parte 9)

Obtención de la Cepa que Muestra Reversión de la Auxotrofia de Uracilo

En el caso de reversión de la auxotrofia de uracilo, se usó el siguiente procedimiento. Usando el plásmido pRS426 como el patrón y oligonucleótidos (SEQ ID NO: 27 y 28) como conjunto de cebadores, se realizó un análisis por PCR para amplificar un fragmento de PCR de aproximadamente 2 kb del gen URA3. El fragmento de PCR se separó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y se purificó de acuerdo con un procedimiento convencional, seguido de transformación para cancelar la mutación del gen URA3. Cultivando la levadura en un medio de cultivo que no se suplementó con uracilo, se seleccionó un transformante que mostraba la reversión de la capacidad de síntesis de uracilo.

Para confirmar que el transformante obtenido de esta manera era una levadura cuya mutación del gen URA3 se canceló, se realizaron las siguientes operaciones. En primer lugar, se obtuvieron células diploides emparejando el transformante obtenido con la cepa 20GY7 de *Saccharomyces cerevisiae* que tenía el gen URA3 de tipo natural. En las células diploides, se permitió que tuviera lugar la formación de ascus en un medio de formación de ascus. Los asci resultantes se diseccionaron con un micromanipulador para obtener células haploides respectivas, y se analizó la auxotrofia para cada una de las células haploides. Se confirmó que todas las células haploides obtenidas tenían la capacidad de síntesis de uracilo. En casos en los que la reversión de la capacidad de síntesis de uracilo tuvo lugar sin cancelar la mutación del gen URA3, se obtienen células que no tienen la capacidad de síntesis de uracilo entre las células haploides obtenidas como anteriormente.

(Parte 10)

Obtención de una Cepa Poliploide que Tiene la Capacidad de Producir Ácido Láctico

Emparejando los transformantes obtenidos por la combinación de los procedimientos de las Partes 1 a 9, se obtuvo una cepa protótrofa diploide que no tenía auxotrofia. En la cepa protótrofa diploide, se permitió que tuviera lugar la formación de ascus en un medio de formación de ascus, y los asci resultantes se diseccionaron con un micromanipulador para obtener células haploides respectivas. Se analizó la auxotrofia para cada una de las células haploides, y se determinó que las cepas desarrolladas en medio SD (Tabla 1) tenían reversión de la auxotrofia y se consideraron como cepas protótrofas haploides.

[Tabla 2]

Nombre de la cepa	Tipo de emparejamiento	Genotipo
HI003	MAT $\alpha/\alpha$	$\Delta pdc1::XLDH-TRP1 \Delta sed1::XLDH-HIS3 \Delta tdh3::XLDH-URA3 pdc5^{ts-9}$
SU014	MAT $\alpha/\alpha$	$\Delta pdc1::XLDH-TRP1 \Delta sed1::XLDH-URA3 \Delta tdh3::XLDH-HIS3 pdc5^{ts-9}$ <i>lys2-801 leu2-<math>\Delta</math>1</i> Levadura poliploide (auxótrofa)
SE001	MAT $\alpha/\alpha$	$\Delta pdc1::XLDH-TRP1 \Delta tdh3::XLDH-URA3 pdc5^{ts-9}$ Levadura poliploide (protótrofa)
HI003-1B	MAT $\alpha$	$\Delta pdc1::XLDH-TRP1 \Delta sed1::XLDH-HIS3 \Delta tdh3::XLDH-URA3 pdc5^{ts-9}$ Levadura haploide (protótrofa)
SU014-3B	MAT $\alpha$	$\Delta pdc1::XLDH-TRP1 \Delta sed1::XLDH-URA3 \Delta tdh3::XLDH-HIS3 pdc5^{ts-9}$ <i>lys2-801 leu2-<math>\Delta</math>1</i> Levadura haploide (auxótrofa)
SE001-1A	MAT $\alpha$	$\Delta pdc1::XLDH-TRP1 \Delta tdh3::XLDH-HIS3 pdc5^{ts-9}$ <i>lys2-801 leu2-<math>\Delta</math>1</i> Levadura haploide (protótrofa)
SW015	MAT $\alpha$	<i>ura3-52 trp1-<math>\Delta</math>63 his3-<math>\Delta</math>200 pdc5<sup>ts-9</sup> lys2-801 leu1-<math>\Delta</math>1</i> Levadura haploide (auxótrofa)
<b><math>pdc5^{ts-9}</math>: Mutación sensible a la temperatura</b>		

(Ejemplo de Referencia 2)

Procedimiento para Cuantificar Ácido Láctico

- 5 Se confirmó el ácido láctico midiendo la cantidad de ácido láctico en el sobrenadante de centrifugación del cultivo por HPLC en las siguientes condiciones.

Columna: Shim-Pack SPR-H (fabricada por Shimadzu Corporation)

Fase móvil: ácido p-toluenosulfónico 5 mM (caudal: 0,8 ml/min)

- 10 Solución de reacción: ácido p-toluenosulfónico 5 mM, Bis-Tris 20 mM, EDTA·2Na 0,1 mM (caudal: 0,8 ml/min)

Procedimiento de detección: conductividad eléctrica

Temperatura: 45 °C

- 15 La medición de la pureza óptica del ácido L-láctico se realizó por HPLC en las siguientes condiciones.

Columna: TSK-gel Enantio L1 (fabricado y producido por Tosoh Corporation)

Fase móvil: solución acuosa de sulfato de cobre 1 mM

- 20 Caudal: 1,0 ml/min.

Procedimiento de detección: UV 254 nm

Temperatura: 30 °C

La pureza óptica del ácido L-láctico se calculó por la siguiente ecuación.

- 25 **Pureza óptica (%) = 100 x (L-D)/(L+D)**

(en la que L representa la concentración de ácido L-láctico, y D representa la concentración de ácido D-láctico).

(Ejemplo de Referencia 3)

- 30 Preparación de la Membrana porosa (Parte 1)

Se usaron una resina de fluoruro de polivinilideno (PVDF) y N,N-dimetilacetamida (DMAc) como una resina y un disolvente, respectivamente, y estos se agitaron suficientemente a una temperatura de 90 °C para obtener una solución de partida que tenía la siguiente composición.

- 35

[Solución de Partida]

PVDF: 13,0% en peso

- 40 DMAc: 87,0% en peso

Posteriormente, la solución de partida anterior se enfrió a una temperatura de 25 °C y se aplicó a un tejido no tejido de fibra de poliéster (material de base porosa) que tenía una densidad de 0,48 g/cm<sup>3</sup> y un espesor de 220 µm, que se había fijado preliminarmente a una placa de vidrio, y lo resultante se sumergió inmediatamente en un baño de coagulación a una temperatura de 25 °C que tenía la siguiente composición durante 5 minutos para obtener una membrana plana que tenía una capa de resina porosa formada sobre el material de base porosa.

- 45

[Baño de coagulación]

Agua: 30,0% en peso

- 50 DMAc: 70,0% en peso

Esta membrana porosa se desprendió de la placa de vidrio y se sumergió tres veces en agua caliente a una temperatura de 80 °C para retirar por lavado el DMAc, para obtener una membrana de separación. La observación de un área de 9,2 µm x 10,4 µm sobre la superficie de la capa de resina porosa con un microscopio electrónico de barrido a un aumento de 10.000 x reveló que el diámetro medio de todos los poros observables era de 0,1 µm. Posteriormente, se evaluó el coeficiente de permeabilidad al agua pura de la membrana de separación anterior, y resultó ser de 50 x 10<sup>-9</sup> m<sup>3</sup>/m<sup>2</sup>/s/Pa. La desviación típica del tamaño de poro medio fue de 0,035 µm, y la rugosidad de la superficie de la membrana fue de 0,06 µm.

- 55

- 60 (Ejemplo de Referencia 4)

## Preparación de la Membrana porosa (Parte 2)

5 Un homopolímero de fluoruro de vinilideno que tenía un peso molecular medio en peso de 417.000 y  $\gamma$ -butirolactona se disolvieron a una temperatura de 170 °C en proporciones del 38% en peso y el 62% en peso, respectivamente, para preparar una solución de partida. Esta solución de partida se extruyó en una boquilla mientras que se acompañada por  $\gamma$ -butirolactona como un fluido para la formación de la porción hueca, seguido de refrigeración y solidificación del producto resultante en un baño de refrigeración a 20 °C que comprendía una solución acuosa de  $\gamma$ -butirolactona al 80% en peso, para preparar una membrana de fibras huecas.

10 Posteriormente, se mezclaron el 14% en peso de un homopolímero de fluoruro de vinilideno que tenía un peso molecular medio en peso de 284.000, el 1% en peso de propionato de acetato de celulosa (fabricado por Eastman Chemical Company, CAP482-0,5), el 77% en peso de N-metil-2-pirrolidona, el 5% en peso de sorbitán de ácidos grasos de aceite de coco (fabricado por Sanyo Chemical Industries, Ltd.; nombre comercial "IONET T-20C" (marca registrada)) y el 3% en peso de agua y se disolvieron a una temperatura de 95 °C, para ajustar una solución de partida. Esta solución de partida se aplicó de forma uniforme a la superficie de la membrana de fibras huecas y se dejó coagular inmediatamente en un baño de agua para preparar la membrana de fibras huecas (membrana porosa) usada en la presente invención. El tamaño de poro medio de la superficie en el lado del líquido a procesar de la membrana de fibras huecas obtenida (membrana de separación) fue de 0,05  $\mu\text{m}$ . Se comprobó que el coeficiente de permeabilidad al agua pura de la membrana de fibras huecas, que es la membrana de separación anterior, era de 5,5 x 10<sup>-9</sup> m<sup>3</sup>/m<sup>2</sup>sPa. La desviación típica del tamaño de poro medio fue de 0,006  $\mu\text{m}$ .

(Ejemplo 1)

25 Producción de Ácido Láctico por Fermentación Continua Usando Levadura Poliploide (Protótrofa) que Tiene la Capacidad de Producir Ácido Láctico (Parte 1)

30 Usando la cepa de levadura HI003 preparada en el Ejemplo de Referencia 1, se produjo ácido láctico con el dispositivo de fermentación continua de la figura 1, y el medio SC4 que tenía la composición mostrada en la Tabla 3. El medio de cultivo se sometió a autoclavado a 121 °C durante 15 minutos antes del uso. Como los miembros para el elemento de la membrana de separación, se usaron productos moldeados de acero inoxidable y resina de polisulfona. Como la membrana de separación, se usó la membrana porosa preparada en el Ejemplo de Referencia 3 que se ha descrito anteriormente.

[Tabla 3]	
NITRÓGENO DE LEVADURA SIN AA Y AS	1,7 g
(fabricado por Difco)	
Suplementos de un medio sintético deficiente de levadura sin triptófano	3,84 g
Sulfato amónico	1,5 g
Glucosa	100 g
hasta 1 l	

35 Las condiciones de funcionamiento en el Ejemplo 1 fueron las que se indican a continuación.

40 Capacidad del recipiente de reacción de fermentación: 2 (l)  
 Capacidad del recipiente de separación por membrana: 0,5 (l)  
 Membrana de separación usada: filtro de fluoruro de polivinilideno (Ejemplo de Referencia 3)  
 Área de filtración eficaz del elemento de separación por membrana: 60 cm<sup>2</sup>  
 Ajuste de la temperatura: 32 (°C)  
 Volumen de ventilación en el recipiente de reacción de fermentación: 0,05 (l/min)  
 Volumen de ventilación en el recipiente de separación por membrana: 0,3 (l/min)  
 45 Velocidad de agitación en el recipiente de reacción de fermentación: 100 (rpm)  
 Ajuste de pH: ajustado a pH 5 con Ca(OH)<sub>2</sub> 8 N  
 Velocidad de alimentación del medio de fermentación de ácido láctico: controlada de forma variable dentro del intervalo de 50 a 300 ml/h.  
 Cantidad del líquido que circula por el dispositivo de circulación del líquido de fermentación: 0,1 (l/min)  
 50 Control de la cantidad de permeación del líquido a través de la membrana: control del caudal por la diferencia de presión transmembrana (controlada a una diferencia de presión transmembrana de 0,1 kPa a un mínimo de 20 kPa).

55 La capa de cultivo que comprendía el elemento de la membrana de separación se sometió a autoclavado a 121 °C durante 20 minutos.

Para la evaluación de la concentración de ácido láctico, que es el producto, se usó el análisis por HPLC que se ha descrito anteriormente mostrado en el Ejemplo de Referencia 2, y para la medición de la concentración de glucosa, se usó "Glucose Test Wako C" (marca registrada) (fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.).

5 En primer lugar, la cepa HI003 se cultivó en 5 ml de medio SC4 en un tubo de ensayo durante una noche con agitación para obtener un cultivo (pre-pre-precultivo). El cultivo obtenido se inoculó en 100 ml de medio SC4 fresco y se sometió a cultivo en un matraz Sakaguchi de 500 ml durante 24 horas a una temperatura de 30 °C con agitación (pre-precultivo). El pre-precultivo se inoculó en 1,5 l de medio SC4 en el dispositivo de fermentación continua mostrado en la figura 1, y el recipiente de reacción de fermentación 1 se agitó con el agitador 5 fijado al mismo. El volumen de ventilación, la temperatura y el pH en el recipiente de reacción de fermentación 1 se ajustaron, y el cultivo se realizó durante 24 horas sin hacer funcionar la bomba circulante del medio de cultivo de fermentación 11 (precultivo). Inmediatamente después de la finalización del precultivo, la bomba circulante del medio de cultivo de fermentación 11 se puso en funcionamiento, y la producción de ácido láctico por fermentación continua se realizó por cultivo continuo en las condiciones de, además de las condiciones de funcionamiento en las que se realizó el cultivo, aireación del recipiente de separación por membrana 12, suministro continuo de medio SC4 y control de la cantidad de permeación del líquido a través de la membrana, de tal forma que la cantidad del medio de cultivo de fermentación en el dispositivo de fermentación continua del tipo separación por membrana se convirtió en 2 l. La cantidad de permeación del líquido a través de la membrana durante la prueba de fermentación continua se controló apropiadamente por el aparato de control de la diferencia de presión 3, de tal forma que la diferencia de presión transmembrana se convirtió en un mínimo de 0,1 kPa y menos de 20 kPa. La concentración del ácido láctico producido y la concentración de la glucosa restante en el medio de cultivo de fermentación permeado a través de la membrana se midieron según fue apropiado.

25 Como resultado de las 800 horas de la prueba de fermentación continua, fue posible una producción estable de ácido láctico por fermentación continua como se muestra en la Tabla 6.

(Ejemplo 2)

30 Producción de Ácido Láctico por Fermentación Continua Usando Levadura Poliploide (Protótrofa) que Tiene la Capacidad de Producir Ácido Láctico (Parte 2)

35 Usando la cepa de levadura HI003 preparada en el Ejemplo de Referencia 1, se produjo ácido láctico con el dispositivo de fermentación continua mostrado en la figura 2, y el medio SC4 que tenía la composición mostrada en la Tabla 3. El medio de cultivo se sometió a autoclavado a 121 °C durante 15 minutos antes del uso. Como los miembros para el elemento de la membrana de separación, se usaron productos moldeados de acero inoxidable y resina de polisulfona. Como la membrana de separación, se usó la membrana de separación porosa preparada en el Ejemplo de Referencia 3 que se ha descrito anteriormente.

40 Las condiciones de funcionamiento en el Ejemplo 2 fueron como se indica a continuación.

Capacidad del recipiente de reacción de fermentación: 2 (l)

Membrana de separación usada: filtro de fluoruro de polivinilideno (Ejemplo de Referencia 3)

Área de filtración eficaz del elemento de separación por membrana: 120 cm<sup>2</sup>

Ajuste de la temperatura: 32 (°C)

45 Volumen de ventilación en el recipiente de reacción de fermentación: 0,05 (l/min)

Velocidad de alimentación del medio de fermentación de ácido láctico: controlada de forma variable dentro del intervalo de 50 a 300 ml/h.

Velocidad de agitación en el recipiente de reacción de fermentación: 800 (rpm)

Ajuste de pH: ajustado a pH 5 con Ca(OH)<sub>2</sub> 8 N

50 Control de la cantidad de permeación del líquido a través de la membrana: control del caudal por la diferencia de presión transmembrana (controlada a una diferencia de presión transmembrana de 0,1 kPa a un mínimo de 20 kPa).

55 El recipiente de cultivo que comprendía el elemento de la membrana de separación se sometió a autoclavado a 121 °C durante 20 minutos.

60 Para la evaluación de la concentración de ácido láctico, que es el producto, se usó el análisis por HPLC que se ha descrito anteriormente mostrado en el Ejemplo de Referencia 2, y para la medición de la concentración de glucosa, se usó "Glucose Test Wako C" (marca registrada) (fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.).

En primer lugar, la cepa HI003 se cultivó en 5 ml de medio SC4 en un tubo de ensayo durante una noche con agitación para obtener un cultivo (pre-pre-precultivo). El cultivo obtenido se inoculó en 100 ml de medio SC4 fresco y se sometió a cultivo en un matraz Sakaguchi de 500 ml durante 24 horas a una temperatura de 30 °C con agitación

(pre-precultivo). El pre-precultivo se inoculó a 1,5 l de medio SC4 en el dispositivo de fermentación continua del tipo separación por membrana mostrado en la figura 2, y el recipiente de reacción de fermentación 1 se agitó con el agitador 5 fijado al mismo a 400 rpm. El volumen de ventilación, la temperatura y el pH en el recipiente de reacción de fermentación 1 se ajustaron, y el cultivo se realizó durante 24 horas (precultivo). Inmediatamente después de la finalización del precultivo, la producción de ácido láctico por fermentación continua se realizó por el suministro continuo de medio SC4 y el cultivo continuo al mismo tiempo que se controlaba la cantidad de permeación del líquido a través de la membrana, de tal forma que la cantidad del medio de cultivo de fermentación en el dispositivo de fermentación continua del tipo separación por membrana se convirtió en 1,5 l. La cantidad de permeación del líquido a través de la membrana durante la prueba de fermentación continua se controló apropiadamente por el aparato de control de la diferencia de presión 3, de tal forma que la diferencia de presión transmembrana se convirtió en un mínimo de 0,1 kPa y menos de 20 kPa. La concentración del ácido láctico producido y la concentración de la glucosa restante en el medio de cultivo de fermentación permeado a través de la membrana se midieron según fue apropiado. Además, se midieron el rendimiento del ácido láctico con respecto a los sacáridos y la velocidad de producción de ácido láctico, que se calcularon a partir de la glucosa suministrada calculada a partir de las concentraciones de ácido láctico y glucosa.

El resultado de 800 horas de la prueba de fermentación continua se muestra en la Tabla 6. La producción estable de ácido láctico por fermentación continua fue posible mediante el procedimiento de la presente invención para la producción de ácido láctico usando el dispositivo de fermentación continua mostrado en la figura 2.

(Ejemplo 3)

Producción de Ácido Láctico por Fermentación Continua Usando Levadura Poliploide (Protótrofa) que Tiene la Capacidad de Producir Ácido Láctico (Parte 3)

Las operaciones y evaluaciones se realizaron con las mismas condiciones que en el Ejemplo 1, excepto que se usó la membrana porosa preparada en el Ejemplo de Referencia 4 que se ha descrito anteriormente como la membrana de separación. El resultado de 750 horas de la prueba de fermentación continua se muestra en la Tabla 6. La producción estable de ácido láctico por fermentación continua fue posible mediante el procedimiento de la presente invención para la producción de ácido láctico.

(Ejemplo 4)

Producción de Ácido Láctico por Fermentación Continua Usando Levadura Poliploide (Protótrofa) que Tiene la Capacidad de Producir Ácido Láctico (Parte 4)

Las operaciones y evaluaciones se realizaron con las mismas condiciones que en el Ejemplo 2, excepto que se usó la membrana de separación porosa preparada en el Ejemplo de Referencia 4 que se ha descrito anteriormente como la membrana de separación. El resultado de 770 horas de una prueba de fermentación se muestra en la Tabla 6. La producción estable de ácido láctico por fermentación continua fue posible mediante el procedimiento de la presente invención para la producción de ácido láctico.

(Ejemplo Comparativo 1)

Producción de Ácido Láctico por Fermentación Discontinua Usando Levadura Poliploide (Protótrofa) que Tiene la Capacidad de Producir Ácido Láctico

Se realizó la fermentación discontinua, que es el modo más típico de fermentación usando células de levadura, para evaluar su productividad de ácido L-láctico. Usando el medio SC4 mostrado en la Tabla 3, se realizó una prueba de fermentación discontinua usando únicamente el recipiente de reacción de fermentación 1 en el dispositivo de fermentación continua del tipo separación por membrana en la figura 1. El medio de cultivo se sometió a autoclavado a 121 °C durante 15 minutos antes del uso. Además, en este Ejemplo Comparativo 1, la cepa de levadura HI003 preparada en el Ejemplo de Referencia 1 que se ha descrito anteriormente se usó como la levadura, y la concentración de ácido láctico, que es el producto, y sacáridos en el cultivo se cuantificaron usando el análisis por HPLC mostrado en el Ejemplo de Referencia 2 que se ha descrito anteriormente.

Las condiciones de funcionamiento en el Ejemplo Comparativo 1 fueron como se indica a continuación.

Capacidad del recipiente de reacción de fermentación: 2 (l)  
 Ajuste de la temperatura: 32 (°C)  
 Volumen de ventilación en el recipiente de reacción de fermentación: 0,05 (l/min)  
 Velocidad de agitación en el recipiente de reacción de fermentación: 100 (rpm)  
 Ajuste de pH: ajustado a pH 5 con Ca(OH)<sub>2</sub> 8 N



El recipiente de cultivo se sometió a autoclavado a 121 °C durante 20 minutos.

5 En primer lugar, la cepa HI003 se cultivó en 5 ml de un medio de fermentación de ácido láctico en un tubo de ensayo durante una noche con agitación (pre-precultivo). El pre-precultivo se inoculó en 100 ml de un medio de fermentación de ácido láctico fresco y se sometió a un cultivo en un matraz Sakaguchi de 500 ml durante 24 horas con agitación (precultivo). El precultivo se inoculó en 1 l del medio de fermentación de ácido láctico en el dispositivo de fermentación continua del tipo separación por membrana, y el recipiente de reacción de fermentación 1 se agitó con el agitador 5 fijado al mismo a 100 rpm para airear el recipiente de reacción de fermentación 1. La temperatura y el pH se ajustaron y el cultivo de fermentación discontinua se realizó sin hacer funcionar la bomba circulante del medio de cultivo de fermentación 11. La cantidad de crecimiento de la levadura en este momento fue 14 en cuando a una absorbancia a 600 nm. El resultado de la fermentación discontinua se muestra en la Tabla 6. El tiempo de fermentación fue corto, y el rendimiento del ácido láctico con respecto a los sacáridos y la velocidad de producción de ácido láctico fueron inferiores a los de los Ejemplos de la presente invención.

15 (Ejemplo Comparativo 2)

Producción de Ácido Láctico por Fermentación Continua Usando Levadura Haploide (Protótrofa) (Parte 1)

20 Las evaluaciones se realizaron con las mismas condiciones que en el Ejemplo 1, excepto que se usó la cepa de levadura HI003-1B preparada en el Ejemplo de Referencia 1. Como resultado, la diferencia de presión transmembrana se convirtió en un mínimo de 20 kPa 600 horas después, y el cultivo se completó. El resultado de la prueba de fermentación continua se muestra en la Tabla 6. Como resultado, se reveló que puede producirse más ácido láctico y de forma más estable cuando se usa levadura poliploide.

25 (Ejemplo Comparativo 3)

Producción de Ácido Láctico por Fermentación Continua Usando Levadura Haploide (Protótrofa) (Parte 2)

30 Las operaciones y evaluaciones se realizaron con las mismas condiciones que en el Ejemplo 2, excepto que se usó la cepa de levadura HI003-1B preparada en el Ejemplo de Referencia 1. Como resultado, la diferencia de presión transmembrana se convirtió en un mínimo de 20 kPa a las 600 horas, y el cultivo se completó. El resultado de la prueba de fermentación continua se muestra en la Tabla 6. Como resultado, se reveló que puede producirse más ácido láctico y de forma más estable cuando se usa levadura poliploide.

35 (Ejemplo Comparativo 4)

Producción de Ácido Láctico por Fermentación Continua Usando Levadura Haploide (Protótrofa) (Parte 3)

40 Las operaciones y evaluaciones se realizaron con las mismas condiciones que en el Ejemplo 3, excepto que se usó la cepa de levadura HI003-1B preparada en el Ejemplo de Referencia 1. Como resultado, la diferencia de presión transmembrana se convirtió en un mínimo de 20 kPa a las 500 horas y el cultivo se completó. El resultado de la prueba de la fermentación continua se muestra en la Tabla 6. Como resultado, se reveló que puede producirse más ácido láctico y de forma más estable cuando se usa levadura poliploide.

45 (Ejemplo Comparativo 5)

Producción de Ácido Láctico por Fermentación Continua Usando Levadura Haploide (Protótrofa) (Parte 4)

50 Las operaciones y evaluaciones se realizaron con las mismas condiciones que en el Ejemplo 4, excepto que se usó la cepa de levadura HI003-1B preparada en el Ejemplo de Referencia 1. Como resultado, la diferencia de presión transmembrana se convirtió en un mínimo de 20 kPa a las 500 horas y el cultivo se completó. El resultado de la prueba de fermentación continua se muestra en la Tabla 6. Como resultado, se reveló que puede producirse más ácido láctico y de forma más estable cuando se usa levadura poliploide.

55 (Ejemplo Comparativo 6)

Producción de Ácido Láctico por Fermentación Continua Usando Levadura Haploide (Protótrofa) (Parte 1)

60 Las operaciones y evaluaciones se realizaron con las mismas condiciones que en el Ejemplo 1, excepto que se usó la cepa de levadura SU014-3B preparada en el Ejemplo de Referencia 1. Como resultado, la diferencia de presión transmembrana se convirtió en un mínimo de 20 kPa a las 300 horas y el cultivo se completó. El resultado de la prueba de fermentación continua se muestra en la Tabla 6. Como resultado, se reveló que puede producirse más ácido láctico y de forma más estable cuando se usa levadura protótrofa o levadura poliploide.

(Ejemplo Comparativo 7)

Producción de Ácido Láctico por Fermentación Continua Usando Levadura Haploide (Auxótrofa) (Parte 2)

5 Las operaciones y evaluaciones se realizaron con las mismas condiciones que en el Ejemplo 2, excepto que se usó la cepa de levadura SU014-3B preparada en el Ejemplo de Referencia 1. Como resultado, la diferencia de presión transmembrana se convirtió en un mínimo de 20 kPa a las 280 horas y el cultivo se completó. El resultado de la prueba de fermentación continua se muestra en la Tabla 6. Como resultado, se reveló que puede producirse más ácido láctico y de forma más estable cuando se usa levadura protótrofa o levadura poliploide.

(Ejemplo Comparativo 8)

Producción de Ácido Láctico por Fermentación Continua Usando Levadura Haploide (Auxótrofa) (Parte 3)

15 Las operaciones y evaluaciones se realizaron con las mismas condiciones que en el Ejemplo 3, excepto que se usó la cepa de levadura SU014-3B preparada en el Ejemplo de Referencia 1. Como resultado, la diferencia de presión transmembrana se convirtió en un mínimo de 20 kPa a las 350 horas y el cultivo se completó. El resultado de la prueba de fermentación continua se muestra en la Tabla 6. Como resultado, se reveló que puede producirse más ácido láctico y de forma más estable cuando se usa levadura protótrofa o levadura poliploide.

(Ejemplo Comparativo 9)

Producción de Ácido Láctico por Fermentación Continua Usando Levadura Haploide (Auxótrofa) (Parte 4)

25 Las operaciones y evaluaciones se realizaron con las mismas condiciones que en el Ejemplo 4, excepto que se usó la cepa de levadura SU014-3B preparada en el Ejemplo de Referencia 1. Como resultado, la diferencia de presión transmembrana se convirtió en un mínimo de 20 kPa a las 270 horas y el cultivo se completó. El resultado de la prueba de fermentación continua se muestra en la Tabla 6. Como resultado, se reveló que puede producirse más ácido láctico y de forma más estable cuando se usa levadura protótrofa o levadura poliploide.

(Ejemplo 5)

35 Producción de Ácido Láctico por Fermentación Continua Usando Levadura Poliploide (Protótrofa) que Tiene la Capacidad de Producir Ácido Láctico (Parte 5)

40 Las operaciones y evaluaciones se realizaron con las mismas condiciones que en el Ejemplo 1, excepto que se usó el medio de fermentación de ácido láctico descrito en la Tabla 4. El resultado de 800 horas de una prueba de fermentación se muestra en la Tabla 7. Incluso teniendo el medio de fermentación de ácido láctico menos nutrientes que el medio SC4, fue posible una producción estable de ácido láctico por fermentación continua mediante el procedimiento de la presente invención para producir ácido láctico.

[Tabla 4]	
Azúcar sin procesar (fabricado por Muso Co., Ltd.)	50 g
Sulfato amónico	1,5 g
hasta 1 l	

45 (Ejemplo 6)

Producción de Ácido Láctico por Fermentación Continua Usando Levadura Poliploide (Protótrofa) que Tiene la Capacidad de Producir Ácido Láctico (Parte 6)

50 Las operaciones y evaluaciones se realizaron con las mismas condiciones que en el Ejemplo 2, excepto que se usó el medio de fermentación de ácido láctico descrito en la Tabla 4. El resultado de 800 horas de una prueba de fermentación se muestra en la Tabla 7. Incluso teniendo el medio de fermentación de ácido láctico menos nutrientes que el medio SC4, fue posible una producción estable de ácido láctico por fermentación continua mediante el procedimiento de la presente invención para producir ácido láctico.

55 (Ejemplo 7)

Producción de Ácido Láctico por Fermentación Continua Usando Levadura Poliploide (Protótrofa) que Tiene la Capacidad de Producir Ácido Láctico (Parte 7)

Las operaciones y evaluaciones se realizaron con las mismas condiciones que en el Ejemplo 3, excepto que se usó el medio de fermentación de ácido láctico descrito en la Tabla 4. El resultado de 800 horas de una prueba de fermentación se muestra en la Tabla 7. Incluso teniendo el medio de fermentación de ácido láctico menos nutrientes que el medio SC4, fue posible una producción estable de ácido láctico por fermentación continua mediante el procedimiento de la presente invención para producir ácido láctico.

(Ejemplo 8)

Producción de Ácido Láctico por Fermentación Continua Usando Levadura Poliploide (Protótrofa) que Tiene la Capacidad de Producir Ácido Láctico (Parte 8)

Las operaciones y evaluaciones se realizaron con las mismas condiciones que en el Ejemplo 4, excepto que se usó el medio de fermentación de ácido láctico descrito en la Tabla 4. El resultado de 800 horas de una prueba de fermentación se muestra en la Tabla 7. Incluso teniendo el medio de fermentación de ácido láctico menos nutrientes que el medio SC4, fue posible una producción estable de ácido láctico por fermentación continua mediante el procedimiento de la presente invención para producir ácido láctico.

(Ejemplo 9)

Producción de Ácido Láctico por Fermentación Continua Usando Levadura Poliploide (Auxótrofa) que Tiene la Capacidad de Producir Ácido Láctico (Parte 1)

Las operaciones y evaluaciones se realizaron con las mismas condiciones que en el Ejemplo 5, excepto que se usó la cepa de levadura SU014 preparada en el Ejemplo de Referencia 1. El resultado de 700 horas de una prueba de fermentación continua se muestra en la Tabla 7. Aunque el rendimiento del ácido láctico con respecto a los sacáridos y la velocidad de producción de ácido láctico fueron bastante inferiores que en los casos de la levadura poliploide protótrofa, fue posible una producción estable de ácido láctico por fermentación continua durante mucho tiempo.

(Ejemplo 10)

Producción de Ácido Láctico por Fermentación Continua Usando Levadura Poliploide (Auxótrofa) que Tiene la Capacidad de Producir Ácido Láctico (Parte 2)

Las operaciones y evaluaciones se realizaron con las mismas condiciones que en el Ejemplo 6, excepto que se usó la cepa de levadura SU014 preparada en el Ejemplo de Referencia 1. El resultado de 700 horas de una prueba de fermentación se muestra en la Tabla 7. Aunque el rendimiento del ácido láctico con respecto a los sacáridos y la velocidad de producción de ácido láctico fueron bastante inferiores que en los casos de la levadura poliploide protótrofa, fue posible una producción estable de ácido láctico por fermentación continua durante mucho tiempo.

(Ejemplo 11)

Producción de Ácido L-Láctico por Fermentación Continua Usando Levadura Poliploide (Auxótrofa) que Tiene la Capacidad de Producir Ácido Láctico (Parte 3)

Las operaciones y evaluaciones se realizaron con las mismas condiciones que en el Ejemplo 7, excepto que se usó la cepa de levadura SU014 preparada en el Ejemplo de Referencia 1. El resultado de 650 horas de una prueba de fermentación continua se muestra en la Tabla 7. Aunque el rendimiento del ácido láctico con respecto a los sacáridos y la velocidad de producción de ácido láctico fueron bastante inferiores que en los casos de la levadura poliploide protótrofa, fue posible una producción estable de ácido láctico por fermentación continua durante mucho tiempo.

(Ejemplo 12)

Producción de Ácido Láctico por Fermentación Continua Usando Levadura Poliploide (Auxótrofa) que Tiene la Capacidad de Producir Ácido Láctico (Parte 4)

Las operaciones y evaluaciones se realizaron con las mismas condiciones que en el Ejemplo 8, excepto que se usó la cepa de levadura SU014 preparada en el Ejemplo de Referencia 1. El resultado de 670 horas de una prueba de fermentación se muestra en la Tabla 7. Aunque el rendimiento del ácido láctico con respecto a los sacáridos y la velocidad de producción de ácido láctico fueron bastante inferiores que en los casos de la levadura poliploide protótrofa, fue posible una producción estable de ácido láctico por fermentación continua durante mucho tiempo.

(Ejemplo Comparativo 10)

Producción de Ácido Láctico por Fermentación Discontinua Usando Levadura Poliploide (Protótrofa) que Tiene la Capacidad de Producir Ácido Láctico

5 Las operaciones y evaluaciones se realizaron con las mismas condiciones que en el Ejemplo Comparativo 1, excepto que se usó el medio de fermentación de ácido láctico descrito en la Tabla 4. El resultado de la fermentación discontinua se muestra en la Tabla 7. El tiempo de fermentación fue corto, y el rendimiento del ácido láctico con respecto a los sacáridos y la velocidad de producción de ácido láctico fueron inferiores a los de los Ejemplos de la presente invención.

(Ejemplo Comparativo 11)

15 Producción de Ácido Láctico por Fermentación Discontinua Usando Levadura Poliploide (Auxótrofa) que Tiene la Capacidad de Producir Ácido Láctico

20 Las operaciones y evaluaciones se realizaron con las mismas condiciones que en el Ejemplo Comparativo 2, excepto que se usó la cepa de levadura SU014 preparada en el Ejemplo de Referencia 1. El resultado de la fermentación discontinua se muestra en la Tabla 7. El tiempo de fermentación fue corto, y el rendimiento del ácido láctico con respecto a los sacáridos y la velocidad de producción de ácido láctico fueron inferiores a los de los Ejemplos de la presente invención.

(Ejemplo Comparativo 12)

25 Producción de Ácido Láctico por Fermentación Continua Usando Levadura Haploide (Auxótrofa) que Tiene la Capacidad de Producir Ácido Láctico (Parte 1)

30 Las operaciones y evaluaciones se realizaron con las mismas condiciones que en el Ejemplo 5, excepto que se usó la cepa de levadura SU014-3B preparada en el Ejemplo de Referencia 1. Como resultado, la diferencia de presión transmembrana se convirtió en un mínimo de 20 kPa a las 300 horas y el cultivo se completó. El resultado de la prueba de fermentación continua se muestra en la Tabla 7. Como resultado, se reveló que puede producirse más ácido láctico y de forma más estable cuando se usa levadura poliploide.

(Ejemplo Comparativo 13)

35 Producción de Ácido Láctico por Fermentación Continua Usando Levadura Haploide (Auxótrofa) que Tiene la Capacidad de Producir Ácido Láctico (Parte 2)

40 Las operaciones y evaluaciones se realizaron de la misma manera que en el Ejemplo 6, excepto que se usó la cepa de levadura SU014-3B preparada en el Ejemplo de Referencia 1. Como resultado, la diferencia de presión transmembrana se convirtió en un mínimo de 20 kPa a las 280 horas y el cultivo se completó. El resultado de la prueba de fermentación continua se muestra en la Tabla 7. Como resultado, se reveló que puede producirse más ácido láctico y de forma más estable cuando se usa levadura poliploide.

(Ejemplo Comparativo 14)

45 Producción de Ácido Láctico por Fermentación Continua Usando Levadura Haploide (Auxótrofa) que Tiene la Capacidad de Producir Ácido Láctico (Parte 3)

50 Las operaciones y evaluaciones se realizaron de la misma manera que en el Ejemplo 7, excepto que se usó la cepa de levadura SU014-3B preparada en el Ejemplo de Referencia 1. Como resultado, en el caso de la levadura haploide, la diferencia de presión transmembrana se convirtió en un mínimo de 20 kPa a las 350 horas y el cultivo se completó. El resultado de la prueba de fermentación continua se muestra en la Tabla 7. Como resultado, se reveló que puede producirse más ácido láctico y de forma más estable cuando se usa levadura poliploide.

(Ejemplo Comparativo 15)

60 Producción de Ácido Láctico por Fermentación Continua Usando Levadura Haploide (Auxótrofa) que Tiene la Capacidad de Producir Ácido Láctico (Parte 4)

Las operaciones y evaluaciones se realizaron de la misma manera que en el Ejemplo 8, excepto que se usó la cepa de levadura SU014-3B preparada en el Ejemplo de Referencia 1. Como resultado, la diferencia de presión transmembrana se convirtió en un mínimo de 20 kPa a las 270 horas y el cultivo se completó. El resultado de la

prueba de fermentación continua se muestra en la Tabla 7. Como resultado, se reveló que puede producirse más ácido láctico y de forma más estable cuando se usa levadura poliploide.

(Ejemplo 13)

5 Producción de Ácido Láctico por Fermentación Continua Usando Levadura Poliploide (Protótrofa) que Tiene la Capacidad de Producir Ácido Láctico (Parte 9)

10 Las operaciones y evaluaciones se realizaron con las mismas condiciones que en el Ejemplo 1, excepto que el área de filtración eficaz del elemento de separación por membrana aumentó a 240 cm<sup>2</sup> y se usó el medio de fermentación de ácido láctico 2 descrito en la Tabla 5. Los resultados de 1400 horas de una prueba de fermentación se muestran en las figuras 6 a 8. La producción estable de ácido láctico por fermentación continua fue posible durante mucho tiempo mediante el procedimiento de la presente invención para producir ácido láctico.

15

[Tabla 5]	
Azúcar sin procesar (fabricado por Muso Co., Ltd.)	100 g
Sulfato amónico	1,5 g
hasta 1 l	

(Ejemplo 14)

20 Producción de Ácido Láctico por Fermentación Continua Usando Levadura Poliploide (Protótrofa) que Tiene la Capacidad de Producir Ácido Láctico (Parte 10)

25 Las operaciones y evaluaciones se realizaron con las mismas condiciones que en el Ejemplo 3, excepto que el área de filtración eficaz del elemento de separación por membrana aumentó a 240 cm<sup>2</sup> y se usó el medio de fermentación de ácido láctico 2 descrito en la Tabla 5. Los resultados de 1350 horas de una prueba de fermentación se muestran en las figuras 6 a 8. La producción estable de ácido láctico por fermentación continua fue posible durante mucho tiempo mediante el procedimiento de la presente invención para producir ácido láctico.

(Ejemplo 15)

30 Producción de Ácido Láctico por Fermentación Continua Usando Levadura Poliploide (Protótrofa) que Tiene la Capacidad de Producir Ácido Láctico (Parte 11)

35 Las operaciones y evaluaciones se realizaron con las mismas condiciones que en el Ejemplo 13, excepto que se usó la cepa de levadura SE001 preparada en el Ejemplo de Referencia 1. Los resultados de 1350 horas de una prueba de fermentación se muestran en las figuras 9 a 11. La producción estable de ácido láctico por fermentación continua fue posible durante mucho tiempo mediante el procedimiento de la presente invención para producir ácido láctico.

(Ejemplo 16)

40 Producción de Ácido Láctico por Fermentación Continua Usando Levadura Poliploide (Protótrofa) que Tiene la Capacidad de Producir Ácido Láctico (Parte 12)

45 Las operaciones y evaluaciones se realizaron con las mismas condiciones que en el Ejemplo 14, excepto que se usó la cepa de levadura SE001 preparada en el Ejemplo de Referencia 1. Los resultados de 1350 horas de una prueba de fermentación se muestran en las figuras 9 a 11. La producción estable de ácido láctico por fermentación continua fue posible durante mucho tiempo mediante el procedimiento de la presente invención para producir ácido láctico.

50 (Ejemplo Comparativo 16)

Producción de Ácido Láctico por Fermentación Continua Usando Levadura Haploide (Auxótrofa) que Tiene la Capacidad de Producir Ácido Láctico (Parte 5)

55 Las operaciones y evaluaciones se realizaron con las mismas condiciones que en el Ejemplo 13, excepto que se usó la cepa de levadura SU014-3B preparada en el Ejemplo de Referencia 1. Como resultado, la diferencia de presión transmembrana se convirtió en un mínimo de 20 kPa a las 300 horas y el cultivo se completó. Los resultados de la prueba de fermentación continua se muestran en las figuras 9 a 11. Como resultado, se reveló que puede producirse más ácido láctico y de forma más estable cuando se usa levadura poliploide.

(Ejemplo Comparativo 17)

5 Producción de Ácido Láctico por Fermentación Continua Usando Levadura Haploide (Auxótrofa) que Tiene la Capacidad de Producir Ácido Láctico (Parte 6)

10 Las operaciones y evaluaciones se realizaron con las mismas condiciones que en el Ejemplo 14, excepto que se usó la cepa de levadura SU014-3B preparada en el Ejemplo de Referencia 1. Como resultado, la diferencia de presión transmembrana se convirtió en un mínimo de 20 kPa a las 280 horas y el cultivo se completó. Los resultados de la prueba de fermentación continua se muestran en las figuras 9 a 11. Como resultado, se reveló que puede producirse más ácido láctico y de forma más estable cuando se usa una levadura poliploide.

(Ejemplo Comparativo 18)

15 Producción de Ácido Láctico por Fermentación Continua Usando Levadura Haploide (Auxótrofa) que Tiene la Capacidad de Producir Ácido Láctico (Parte 7)

20 Las operaciones y evaluaciones se realizaron con las mismas condiciones que en el Ejemplo 15, excepto que se usó la cepa de levadura SE001-1A preparada en el Ejemplo de Referencia 1. Como resultado, la diferencia de presión transmembrana se convirtió en un mínimo de 20 kPa a las 300 horas y el cultivo se completó. Los resultados de la prueba de fermentación continua se muestran en las figuras 9 a 11. Como resultado, se reveló que puede producirse más ácido láctico y de forma más estable cuando se usa levadura poliploide.

(Ejemplo Comparativo 19)

25 Producción de Ácido Láctico por Fermentación Continua Usando Levadura Haploide (Auxótrofa) que Tiene la Capacidad de Producir Ácido Láctico (Parte 8)

30 Las operaciones y evaluaciones se realizaron con las mismas condiciones que en el Ejemplo 16, excepto que se usó la cepa de levadura SE001-1A preparada en el Ejemplo de Referencia 1. Como resultado, la diferencia de presión transmembrana se convirtió en un mínimo de 20 kPa a las 270 horas y el cultivo se completó. Los resultados de la prueba de fermentación continua se muestran en las figuras 9 a 11. Como resultado, se reveló que puede producirse más ácido láctico y de forma más estable cuando se usa levadura poliploide.

Las condiciones de cultivo en los Ejemplos 1 a 16 y los Ejemplos Comparativos 1 a 19 se muestran en la Tabla 8.

[Tabla 6]

	Ejemplo 1	Ejemplo 2	Ejemplo 3	Ejemplo 4	Ejemplo Comparativo 1	Ejemplo Comparativo 2	Ejemplo Comparativo 3	Ejemplo Comparativo 4	Ejemplo Comparativo 5	Ejemplo Comparativo 6	Ejemplo Comparativo 7	Ejemplo Comparativo 8	Ejemplo Comparativo 9
Tiempo de fermentación (h)	800	800	750	770	72	600	600	500	500	300	280	350	270
Glucosa total suministrada	8424	7896	6653	7500	100	6312	5922	4158	4687	3240	2820	3000	2420
Ácido L-láctico total producido (g)	5882	5764	4790	5600	26	4366	4323	2993	3857	1920	1700	1770	1488
Glucosa no usada	20	10	20	10	0	20	10	20	10	40	70	40	20
Rendimiento del ácido L-láctico con respecto a glucosa	0,7	73	0,72	0,75	0,22	0,65	0,67	0,66	0,68	0,6	0,62	0,59	0,62
Velocidad de producción de ácido L-láctico (g/l/h)	3,7	4,8	3,2	4,8	0,36	3,5	4,6	3	4,5	3,2	4	2,5	3,8

[Tabla 7]

	Ejemplo 5	Ejemplo 6	Ejemplo 7	Ejemplo 8	Ejemplo 9	Ejemplo 10	Ejemplo 11	Ejemplo 12	Ejemplo Comparativo 10	Ejemplo Comparativo 11	Ejemplo Comparativo 12	Ejemplo Comparativo 13	Ejemplo Comparativo 14	Ejemplo Comparativo 15
Tiempo de fermentación (h)	800	800	750	770	700	700	650	670	72	70	300	280	350	270
Glucosa total suministrada	6362	10530	5020	9876	5610	8057	4170	8283	100	100	2354	3586	2302	3295
Ácido L-láctico total producido (g)	4440	7680	3600	7392	3360	4900	2535	4959	26	22	1350	2128	1312	1998
Glucosa no usada	20	10	20	20	10	25	15	20	0	0	27	40	40	20
Rendimiento del ácido L-láctico con respecto a glucosa	0,7	0,73	0,72	0,75	0,6	0,61	0,61	0,6	0,26	0,22	0,58	0,6	0,58	0,61
Velocidad de producción de ácido L-láctico (g/l/h)	3,7	4,8	3,2	4,8	3,2	3,5	2,6	3,7	0,36	0,32	3	3,8	2,5	3,7



[Tabla 8]

	Muestra de Levadura	Aparato de cultivo	Membrana de separación	Medio de cultivo	Resultado	Área de membrana de separación
Ejemplo 1	HI003	Figura 1	Ejemplo de Referencia 3	Tabla 3	Tabla 6	60 cm <sup>2</sup>
Ejemplo 2	HI003	Figura 2	Ejemplo de Referencia 3	Tabla 3	Tabla 6	120 cm <sup>2</sup>
Ejemplo 3	HI003	Figura 1	Ejemplo de Referencia 4	Tabla 3	Tabla 6	60 cm <sup>2</sup>
Ejemplo 4	HI003	Figura 2	Ejemplo de Referencia 4	Tabla 3	Tabla 6	120 cm <sup>2</sup>
Ejemplo 5	HI003	Figura 1	Ejemplo de Referencia 3	Tabla 4	Tabla 7	60 cm <sup>2</sup>
Ejemplo 6	HI003	Figura 2	Ejemplo de Referencia 3	Tabla 4	Tabla 7	120 cm <sup>2</sup>
Ejemplo 7	HI003	Figura 1	Ejemplo de Referencia 4	Tabla 4	Tabla 7	60 cm <sup>2</sup>
Ejemplo 8	HI003	Figura 2	Ejemplo de Referencia 4	Tabla 4	Tabla 7	120 cm <sup>2</sup>
Ejemplo 9	SU014	Figura 1	Ejemplo de Referencia 3	Tabla 4	Tabla 7	60 cm <sup>2</sup>
Ejemplo 10	SU014	Figura 2	Ejemplo de Referencia 3	Tabla 4	Tabla 7	120 cm <sup>2</sup>
Ejemplo 11	SU014	Figura 1	Ejemplo de Referencia 4	Tabla 4	Tabla 7	60 cm <sup>2</sup>
Ejemplo 12	SU014	Figura 2	Ejemplo de Referencia 4	Tabla 4	Tabla 7	120 cm <sup>2</sup>
Ejemplo 13	HI003	Figura 1	Ejemplo de Referencia 3	Tabla 5	Figura 6, Figura 7, Figura 8	240 cm <sup>2</sup>
Ejemplo 14	HI003	Figura 1	Ejemplo de Referencia 4	Tabla 5	Figura 6, Figura 7, Figura 8	240 cm <sup>2</sup>
Ejemplo 15	SE001	Figura 1	Ejemplo de Referencia 5	Tabla 5	Figura 9, Figura 10, Figura 11	240 cm <sup>2</sup>
Ejemplo 16	SE001	Figura 1	Ejemplo de Referencia 6	Tabla 5	Figura 9, Figura 10, Figura 11	240 cm <sup>2</sup>
Ejemplo Comparativo 1	HI003	Figura 1 (Cultivo Discontinuo)		Tabla 3	Tabla 6	
Ejemplo Comparativo 2	HI003-1B	Figura 1	Ejemplo de Referencia 3	Tabla 3	Tabla 6	60 cm <sup>2</sup>
Ejemplo Comparativo 3	HI003-1B	Figura 2	Ejemplo de Referencia 3	Tabla 3	Tabla 6	120 cm <sup>2</sup>
Ejemplo Comparativo 4	HI003-1B	Figura 1	Ejemplo de Referencia 4	Tabla 3	Tabla 6	60 cm <sup>2</sup>
Ejemplo Comparativo 5	HI003-1B	Figura 2	Ejemplo de Referencia 4	Tabla 3	Tabla 6	120 cm <sup>2</sup>
Ejemplo Comparativo 6	SU014-3B	Figura 1	Ejemplo de Referencia 3	Tabla 3	Tabla 6	60 cm <sup>2</sup>
Ejemplo Comparativo 7	SU014-3B	Figura 2	Ejemplo de Referencia 3	Tabla 3	Tabla 6	120 cm <sup>2</sup>
Ejemplo Comparativo 8	SU014-3B	Figura 1	Ejemplo de Referencia 4	Tabla 3	Tabla 6	60 cm <sup>2</sup>
Ejemplo Comparativo 9	SU014-3B	Figura 2	Ejemplo de Referencia 4	Tabla 3	Tabla 6	120 cm <sup>2</sup>
Ejemplo Comparativo 10	HI003	Figura 1 (Cultivo Discontinuo)		Tabla 4	Tabla 7	

Ejemplo Comparativo 11	SU014	Figura 1 (Cultivo Discontinuo)		Tabla 4	Tabla 7	
Ejemplo Comparativo 12	SU014-3B	Figura 1	Ejemplo de Referencia 3	Tabla 4	Tabla 7	60 cm <sup>2</sup>
Ejemplo Comparativo 13	SU014-3B	Figura 2	Ejemplo de Referencia 3	Tabla 4	Tabla 7	120 cm <sup>2</sup>
Ejemplo Comparativo 14	SU014-3B	Figura 1	Ejemplo de Referencia 4	Tabla 4	Tabla 7	60 cm <sup>2</sup>
Ejemplo Comparativo 15	SU014-3B	Figura 2	Ejemplo de Referencia 4	Tabla 4	Tabla 7	120 cm <sup>2</sup>
Ejemplo Comparativo 16	SU014-3B	Figura 1	Ejemplo de Referencia 3	Tabla 5	Figura 6, Figura 7, Figura 8	240 cm <sup>2</sup>
Ejemplo Comparativo 17	SU014-3B	Figura 1	Ejemplo de Referencia 4	Tabla 5	Figura 6, Figura 7, Figura 8	240 cm <sup>2</sup>
Ejemplo Comparativo 18	SE001-1A	Figura 1	Ejemplo de Referencia 5	Tabla 5	Figura 9, Figura 10, Figura 11	240 cm <sup>2</sup>
Ejemplo Comparativo 19	SE001-1A	Figura 1	Ejemplo de Referencia 6	Tabla 5	Figura 9, Figura 10, Figura 11	240 cm <sup>2</sup>

APLICABILIDAD INDUSTRIAL

- 5 Mediante el procedimiento de la presente invención para producir ácido láctico por fermentación continua usando levadura poliploide como la muestra de levadura, una fermentación continua, en la que una alta productividad de ácido láctico, que es el producto de fermentación deseado, puede mantenerse de forma estable durante mucho tiempo, es posible con unas simples condiciones de funcionamiento. Por lo tanto, puede producirse ampliamente de forma estable ácido láctico en forma de un producto de fermentación a un bajo coste en la industria de la fermentación.

**LISTA DE SECUENCIAS**

<110> Toray Industries, Inc.  
 <120> Procedimiento para producir ácido láctico por fermentación continua  
 <130> 08112  
 <160> 28  
 5 <140> EP 09708832.2  
 <141> 03-02-2009  
 <170> PatentIn versión 3.1  
 <210> 1  
 <211> 999  
 10 <212> ADN  
 <213> xenopus laevis  
 <400> 1

**atggcaactg tgaaggataa actcatccac aatgtggtca aggaggagtc gctccccag 60**  
**aacaaggtca ccattgtggg tgtgggggcc gtgggcatgg cctgtgccat cagtgtcctg 120**  
**cagaaggatt tggcagatga gcttgactt gttgatgtga tagaagacaa actgaagggg 180**  
**gaaatgatgg atctccagca tggcagtctg ttccttcgta cccccaagat tgtctcaggg 240**  
**aaagattaca gcgtcactgc aaactccaag ctggtagtgt tgacggccgg ggcccgtcag 300**  
**caggagggag agagtcgcct gaatctggtt cagcgcaatg tcaacatctt caaatctatc 360**  
**attccaaca ttgtcaagta cagccccaac tgcaccctgc tcatcgtctc caaccctgag 420**  
**gacattctga catatgtggc ctggaagatc agtggattcc ccaaaaaccg tgtcattggc 480**  
**agcggctgca atttggactc tgcccgtttc cgttacctca tggggcagaa gtttgggagc 540**  
**cacaccaga gctgccacgg ttgggtcatt ggggaacacg gagactcgag tgtgccagtg 600**  
**tggagtgggg tgaatgtggc tggcgtgtcc ctgaaaacc tgcaccccga tattgggagt 660**  
**gacgcagaca aggagaactg gaaggaggtg cacaagcagg ttgtggacag cgcctatgaa 720**  
**gtgatcaagc tgaagggcta cacctcctgg gctattggcc tgtccgtagc tgacctgtct 780**  
**gagagtatcc tgaagaacct ccgccgagtc catccattt ccacaatggt caagggcatg 840**  
**tacggcgtga ataatgatgt tttcctcagt gtcccctgtg tgttgggcaa cttgggcatc 900**  
**acagacgtgg ttaacatgac gctgaaggca gatgaagagg atcgcttacg caagagcgca 960**  
**gacaccctgt gggccatcca gaaggagctg cagttctag 999**

15 <210> 2  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> cebador  
 20 <400> 2  
 gtcgacatgg caactgtgaa ggataa 26  
 <210> 3  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 25 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> cebador  
 <400> 3  
 gcggccgcct agaactgcag ctccct 26  
 30 <210> 4  
 <211> 85  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> cebador  
 <400> 4

**tctcaattat tattttctac tcataacctc acgcaaaata acacagtcaa atcaatcaaa 60**

**atggcaactg tgaaggataa actca 85**

5 <210> 5  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>

10 <223> cebador  
 <400> 5  
 agcgtatca cgaggccctt 20  
 <210> 6  
 <211> 60

15 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> cebador  
 <400> 6

20 gaattaattc ttgaagacga aagggcctcg tgatagcct agattgtact gagagtgcac 60  
 <210> 7  
 <211> 80  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

25 <220>  
 <223> cebador  
 <400> 7

**tatttttcgt tacataaaaa tgcttataaa actttaacta ataattagag attaaatcgc 60**

**ctgtgcggta ttccacaccg 80**

30 <210> 8  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> cebador

35 <400> 8  
 caaatatcgt ttgaatatt ttccg 25  
 <210> 9  
 <211> 85  
 <212> ADN

40 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> cebador  
 <400> 9

**tattgattta tagtcgtaac tacaagaca agcaaaataa aatacgttcg ctctattaag 60**

**atggcaactg tgaaggataa actca 85**

45 <210> 10  
 <211> 80  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>

50 <223> cebador  
 <400> 10

**aaaaataac ataatactga aagaaagcat taagaaggcg gatgtgtcaa acaccaccgt 60**  
**ctgtgcggta tttcacaccg 80**

<210> 11  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 5 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> cebador  
 <400> 11  
 tagattggcc gtaggggctg 20  
 10 <210> 12  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 15 <223> cebador  
 <400> 12  
 cacgcaacgc gtaagaaaca 20  
 <210> 13  
 <211> 26  
 20 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> cebador  
 <400> 13  
 25 gcggccgcga atttctatg atttat 26  
 <210> 14  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 30 <220>  
 <223> cebador  
 <400> 14  
 aagcttaagc ttgcatgccg gtagag 26  
 <210> 15  
 35 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> cebador  
 40 <400> 15  
 aggcgtatca cgaggccctt 20  
 <210> 16  
 <211> 85  
 <212> ADN  
 45 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> cebador  
 <400> 16

**tttttttagt tttaaaacac caagaactta gtttcgaata aacacacata aacaaacaaa 60**  
**atggcaactg tgaaggataa actca 85**

50 <210> 17  
 <211> 60  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 55 <223> cebador  
 <400> 17  
 gaattaattc ttgaagacga aagggcctcg tgatacgct agattgtact gagagtgcac 60

ES 2 407 639 T3

<210> 18  
 <211> 80  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 5 <220>  
 <223> cebador  
 <400> 18  
     **ctaagtcata aagctataaa aagaaaattt atttaaagtc aagatttaaa gtaaattcac** 60  
     **ctgtgcgga tttcacaccg** 80  
 <210> 19  
 10 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> cebador  
 15 <400> 19  
 atttctaaa ctcttaaat tctac 25  
 <210> 20  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 20 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> cebador  
 <400> 20  
 atgaatcgaa aatgcatta aaata 25  
 25 <210> 21  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 30 <223> cebador  
 <400> 21  
 gacaattctg gttaggtcca agag 24  
 <210> 22  
 <211> 24  
 35 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> cebador  
 <400> 22  
 40 ttaagctgct gcggagcttc cacg 24  
 <210> 23  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 45 <220>  
 <223> cebador  
 <400> 23  
 atgtctgccc ctaagaagat cg 22  
 <210> 24  
 50 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> cebador  
 55 <400> 24  
 ttaagcaagg atttcttaa ctc 24  
 <210> 25  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 60 <213> Artificial

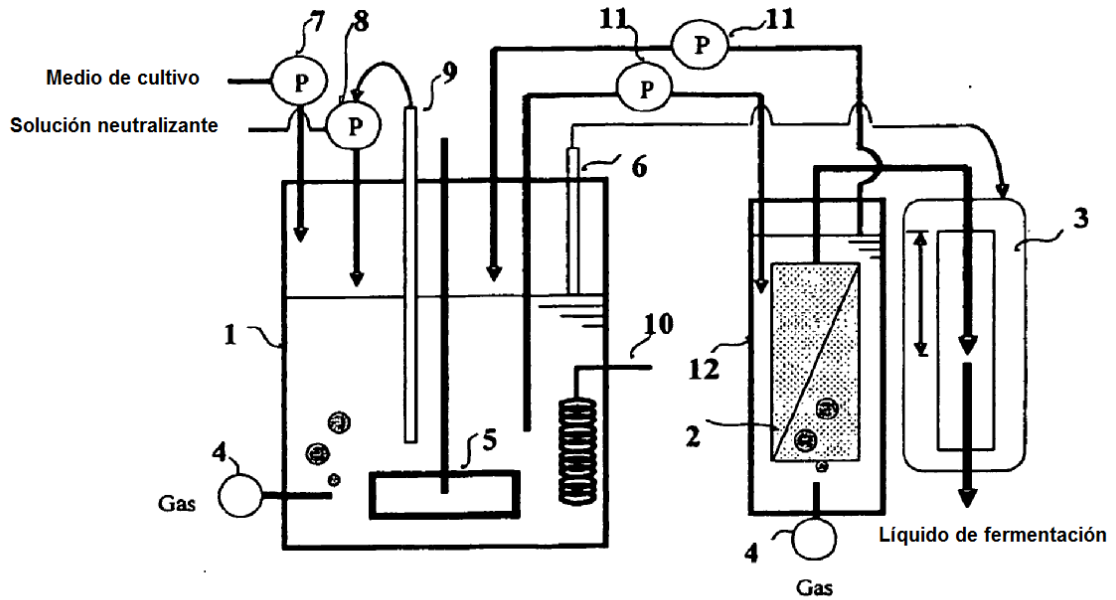
<220>  
 <223> cebador  
 <400> 25  
 atggattcta gaavagttgg tata 24  
 5 <210> 26  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 10 <223> cebador  
 <400> 26  
 ttactgttt tctagataag cttc 24  
 <210> 27  
 <211> 24  
 15 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> cebador  
 <400> 27  
 20 atgtcgaaag ctacataaa gcaa 24  
 <210> 28  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 25 <220>  
 <223> cebador  
 <400> 28  
 ttattttgct ggccgcatct tct 23

**REIVINDICACIONES**

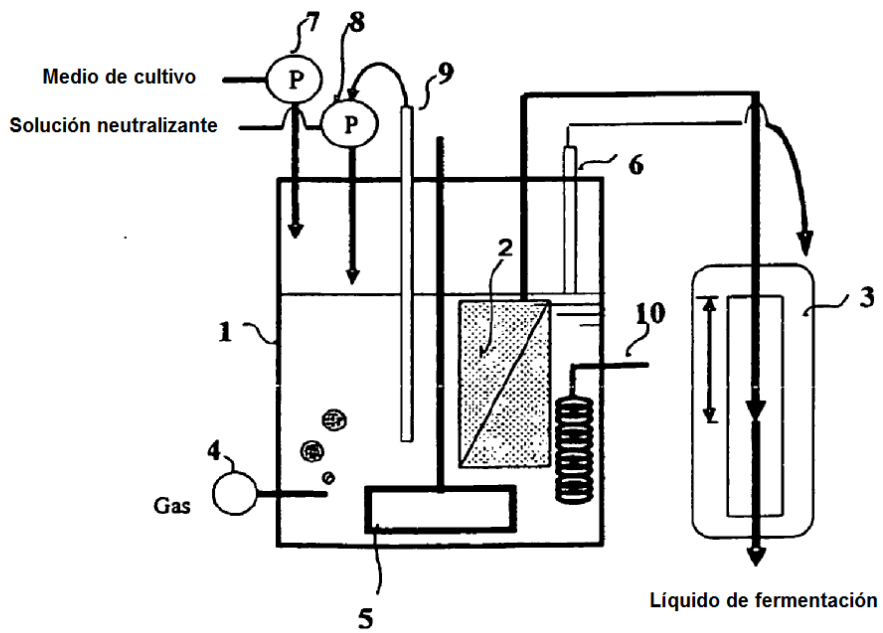
- 5 1. Un procedimiento para producir ácido láctico por fermentación continua, en el que el cultivo de levadura poliploide que tiene la capacidad de producir ácido láctico se filtra a través de una membrana porosa que tiene un tamaño de poro medio de un mínimo de 0,01  $\mu\text{m}$  y menos de 1  $\mu\text{m}$  y el producto se recupera a partir del filtrado, mientras que el líquido no filtrado se retiene o se reintroduce en el cultivo, y al cultivo se le añade una materia prima de fermentación.
- 10 2. El procedimiento para producir ácido láctico de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha filtración se realiza con una diferencia de presión transmembrana de dicha membrana porosa dentro del intervalo de 0,1 kPa a menos de 20 kPa.
- 15 3. El procedimiento para producir ácido láctico de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en el que dicha levadura poliploide es diploide.
- 20 4. El procedimiento para producir ácido láctico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicha levadura poliploide es protótrofa.
- 25 5. El procedimiento para producir ácido láctico de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el rendimiento del ácido láctico con respecto a los sacáridos en dicha fermentación continua es un mínimo del 70%.
- 30 6. El procedimiento para producir ácido láctico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 5, en el que la concentración del ácido láctico acumulado en el cultivo sometido a dicha fermentación continua es un mínimo de 40 g/l.
- 35 7. El procedimiento para producir ácido láctico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en el que la velocidad de producción de ácido láctico durante dicha fermentación continua es un mínimo de 7,5 g/l.
8. El procedimiento para producir ácido láctico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en el que dicha fermentación continua se mantiene durante un mínimo de 400 horas.
9. El procedimiento para producir ácido láctico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dicha levadura poliploide pertenece al género *Saccharomyces*.
10. El procedimiento para producir ácido láctico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicha levadura poliploide es *Saccharomyces cerevisiae*.



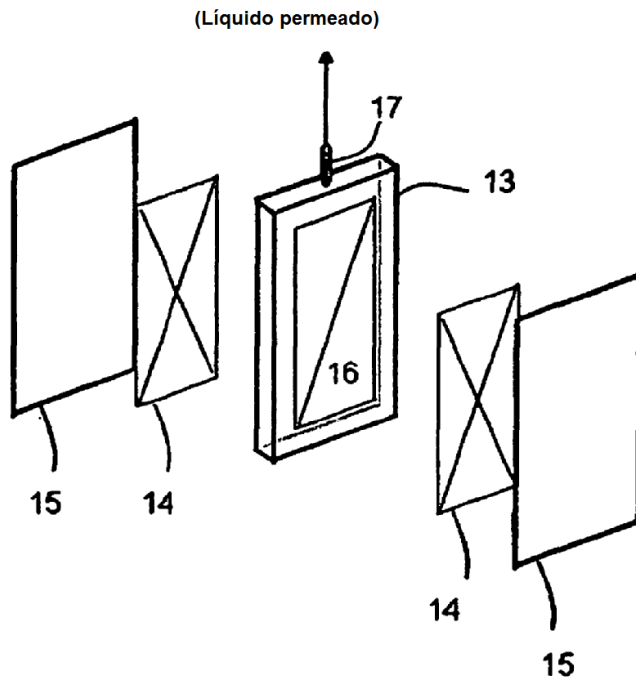
[Fig. 1]



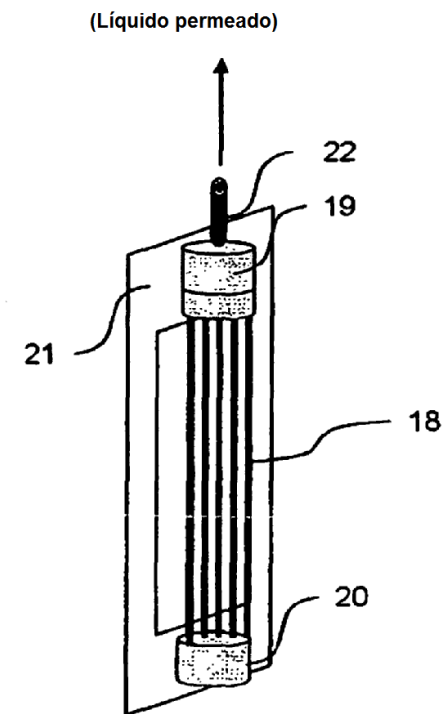
[Fig. 2]



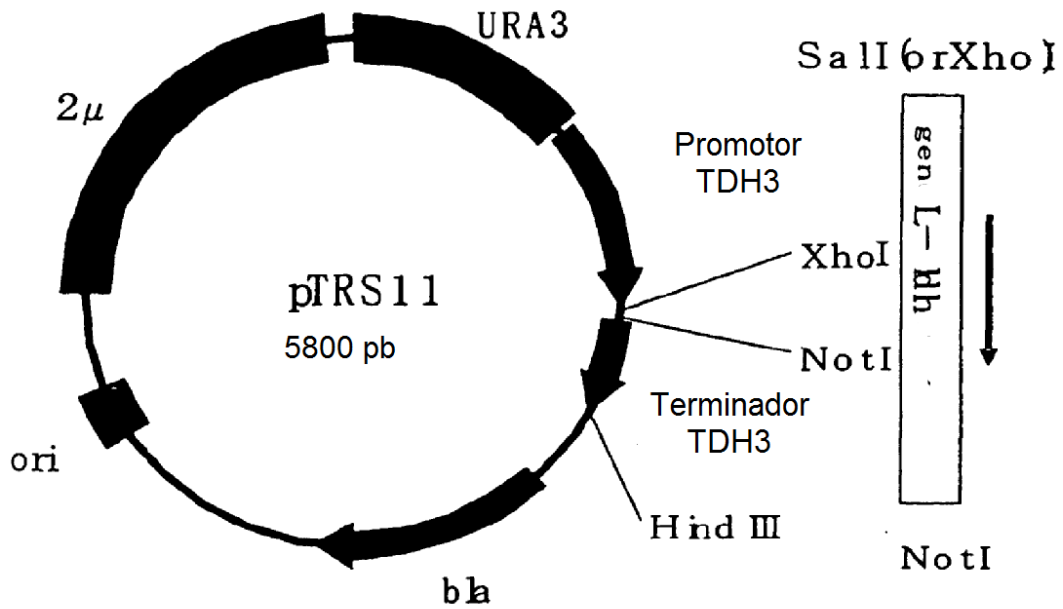
[Fig. 3]



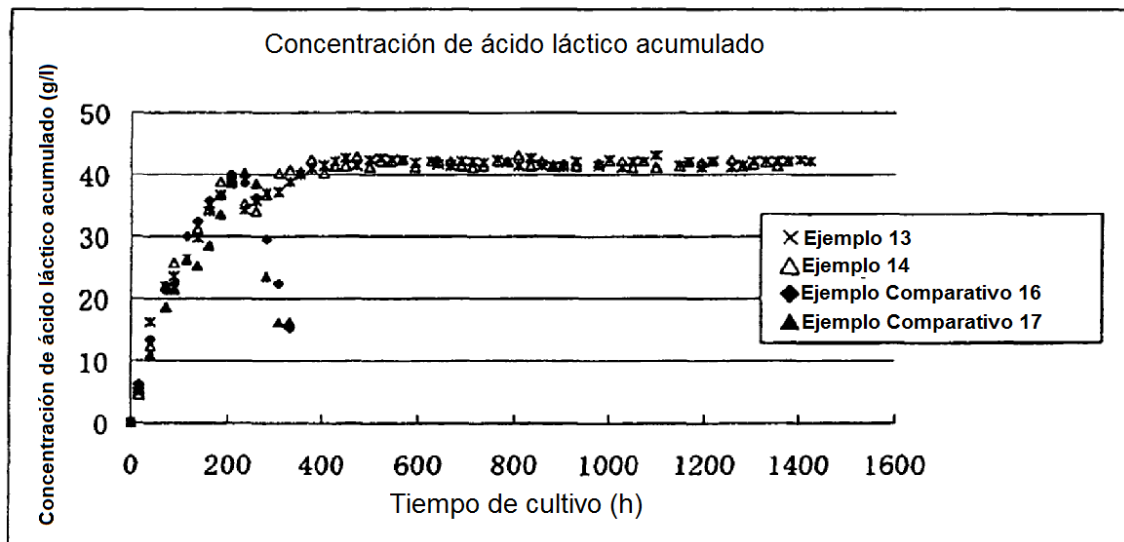
[Fig. 4]



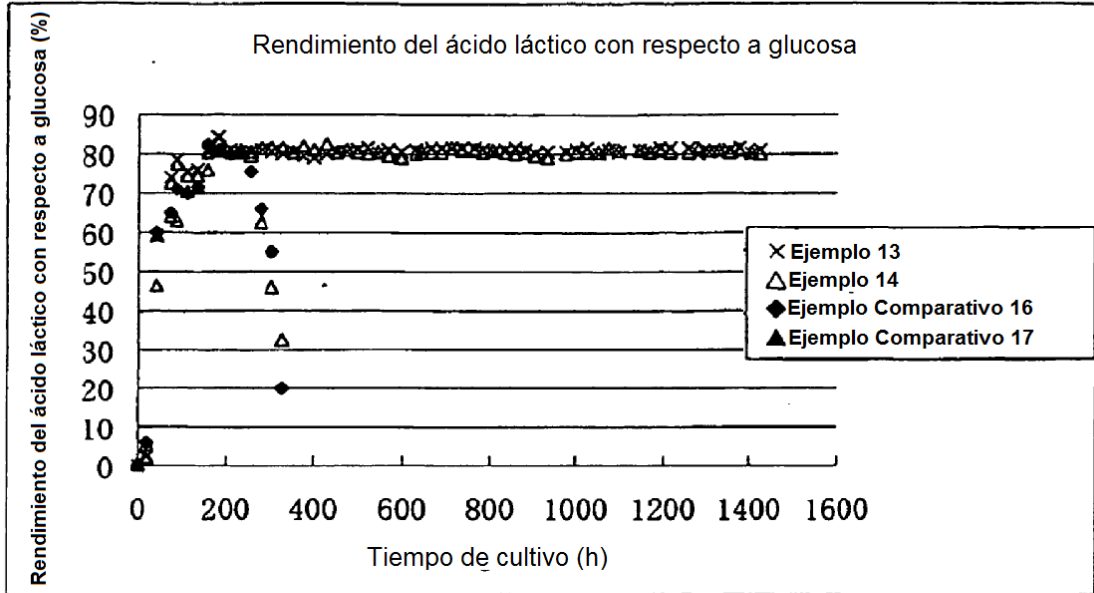
[Fig. 5]



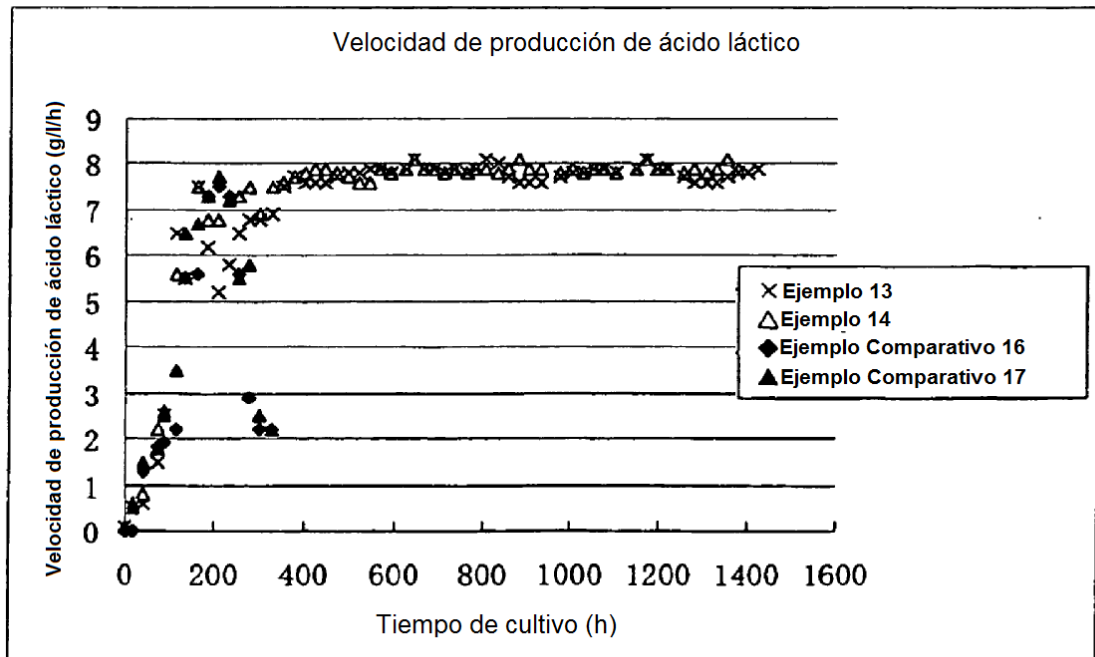
[Fig. 6]



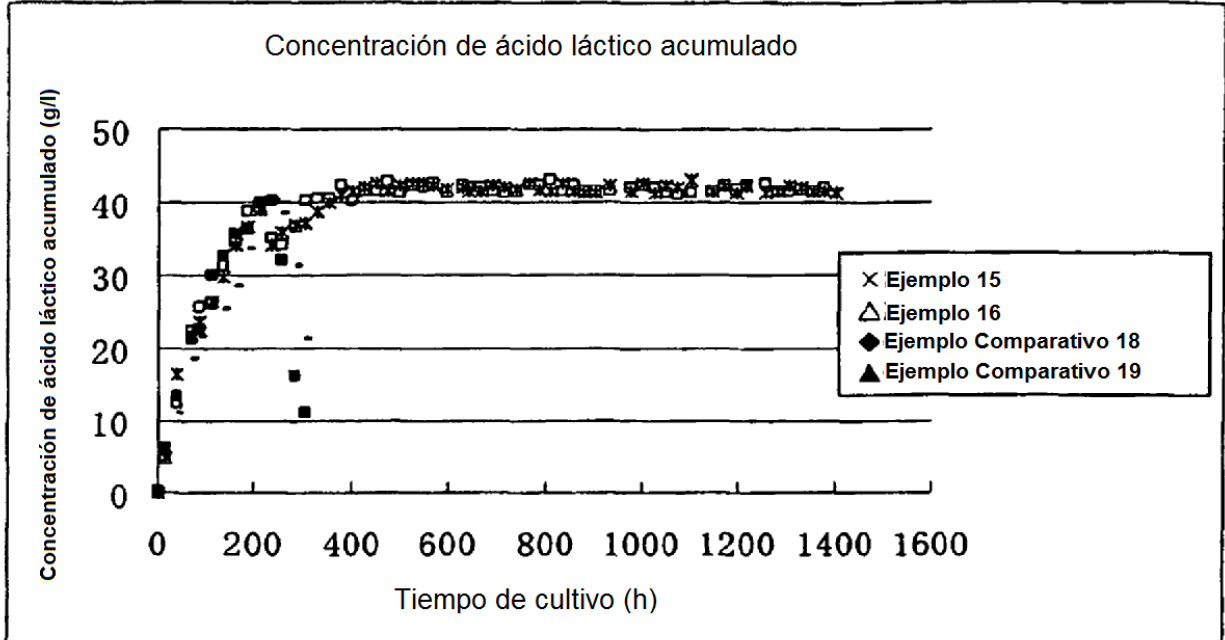
[Fig. 7]



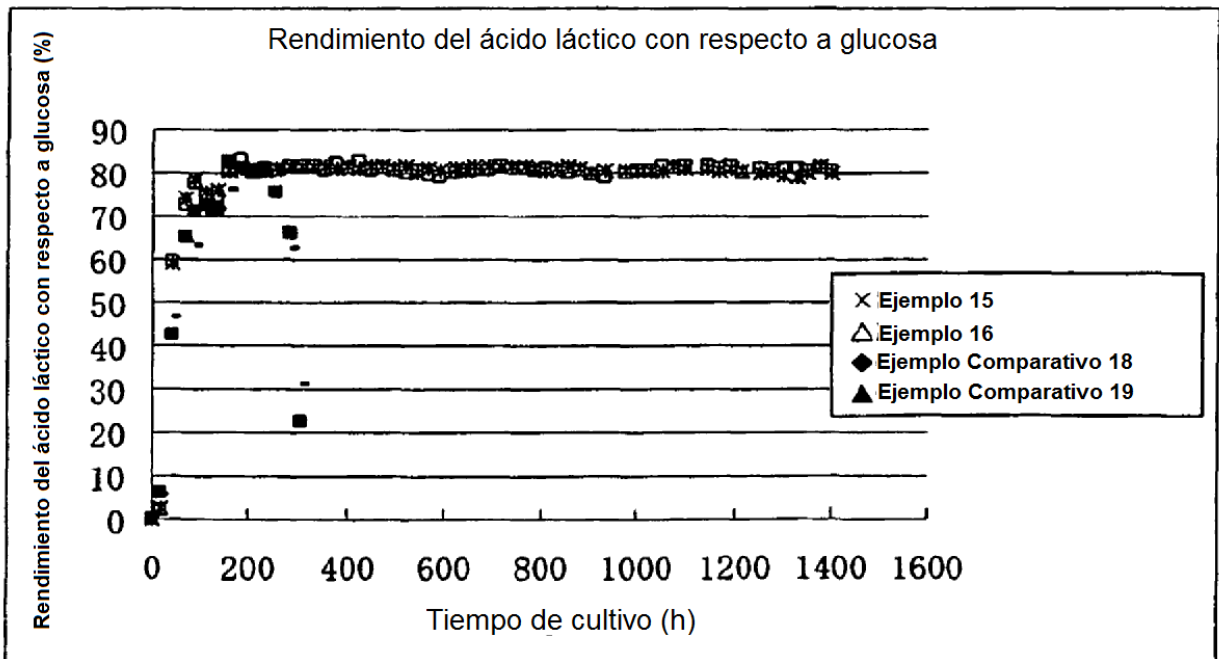
[Fig. 8]



[Fig. 9]



[Fig. 10]



[Fig. 11]

