

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 715 894**

51 Int. Cl.:

C12P 7/06 (2006.01)
C12P 7/40 (2006.01)
C12P 7/18 (2006.01)
C12P 7/16 (2006.01)
C12P 7/48 (2006.01)
C12P 7/46 (2006.01)
C12P 7/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.04.2015** **PCT/JP2015/061207**
87 Fecha y número de publicación internacional: **22.10.2015** **WO15159812**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.04.2015** **E 15780585 (4)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.03.2019** **EP 3133164**

54 Título: **Procedimiento para la producción de sustancias químicas por fermentación continua**

30 Prioridad:

14.04.2014 JP 2014082916
14.04.2014 JP 2014082917

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.06.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

KOBAYASHI, KOJI;
SAWAI, KENJI y
YAMADA, KATSUSHIGE

74 Agente/Representante:

DURAN-CORRETJER, S.L.P

ES 2 715 894 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 para la producción de sustancias químicas por fermentación continua

5 **SECTOR TÉCNICO**

La presente invención se refiere a un procedimiento para producir un producto químico por fermentación continua en condiciones de pH bajo.

10 **ANTECEDENTES TÉCNICOS**

Como el problema de la emisión de dióxido de carbono a la atmósfera y el problema de la energía se han vuelto obvios, los productos químicos derivados de la biomasa representados por materiales poliméricos biodegradables tales como el ácido láctico y los biocombustibles tales como el etanol, han estado atrayendo una gran atención debido a la sostenibilidad y la evaluación del ciclo de vida (LCA) orientada a la naturaleza de dichos productos.

En los casos en que un ácido orgánico tales como el ácido láctico debe ser producido por un microorganismo, el pH del líquido de cultivo disminuye debido al ácido orgánico producido, lo que lleva a una disminución en la productividad del ácido orgánico de interés. Por lo tanto, el pH del líquido de cultivo debe mantenerse constante con un neutralizador. Por ejemplo, el documento de patente 1 da a conocer un procedimiento para producir ácido láctico mediante el cultivo de una levadura, en el que el pH del líquido de cultivo se mantiene mediante neutralización alcalina para mantener la productividad del ácido láctico de la levadura. Sin embargo, en los casos en que el medio se neutraliza utilizando una sustancia alcalina tal como el hidróxido de calcio, dependiendo de la cantidad de sustancia alcalina añadida, se pueden producir subproductos tales como el yeso en la etapa posterior de separación/purificación debido a la influencia de una sustancia ácida tal como el ácido sulfúrico que se añade para la separación de la sal del ácido láctico. Esto hace que la etapa de separación/purificación del ácido láctico sea complicada y, como resultado, aumenta el coste de producción. Es decir, en los casos en que se utiliza un neutralizador, se requiere un coste adicional no solo para la materia prima del neutralizador en sí, sino también para la eliminación/desecho de los subproductos innecesarios tales como el yeso. También para ácidos orgánicos distintos del ácido láctico, se utilizan neutralizadores tales como el hidróxido de sodio para mantener constante el pH del líquido de cultivo durante el cultivo. Por lo tanto, se está estudiando la producción de ácidos orgánicos utilizando levaduras, que son más resistentes al pH bajo que las bacterias. Esto se debe a que, dado que las levaduras se pueden cultivar a un pH más bajo que las bacterias, la cantidad de neutralizador utilizado se puede reducir. Además, se está llevando a cabo la mejora de microorganismos que tienen resistencia a un pH más bajo. Por ejemplo, el documento de patente 3 y el documento de patente 4 dan a conocer procedimientos para producir ácido láctico utilizando cepas mutantes que tienen resistencia al ácido láctico.

La producción de productos químicos distintos de los ácidos orgánicos, tales como etanol, también se lleva a cabo a un pH bajo en algunos casos. El documento de patente 2, por ejemplo, describe la eliminación de la necesidad de ajustar el pH en los casos en que la fermentación de etanol por una levadura se lleva a cabo utilizando, como materia prima, un líquido que contiene azúcar producido por hidrólisis de un recurso de biomasa utilizando un ácido, tal como ácido sulfúrico, y también describe que, dado que el riesgo de contaminación con microorganismos no deseados se puede reducir a un pH bajo, la esterilización del medio y el aparato de fermentación se vuelven innecesarios en tales casos.

Ejemplos de procedimientos de cultivo comunes para microorganismos incluyen cultivo discontinuo, cultivo semicontinuo y cultivo continuo. El documento de patente 5 da a conocer la mejora de la velocidad de producción y el rendimiento de un producto de fermentación mediante cultivo continuo utilizando una membrana de separación.

50 **DOCUMENTOS DE LA TÉCNICA ANTERIOR**

[Documentos de patente]

[Documento de patente 1] JP 2009-171879 A
 55 [Documento de patente 2] JP 2004-344084 A
 [Documento de patente 3] JP 2010-115112 A
 [Documento de patente 4] WO 2012/147903
 [Documento de patente 5] WO 2007/097260

60 **SUMARIO DE LA INVENCION****PROBLEMAS A RESOLVER POR LA INVENCION**

Como se ha mencionado anteriormente, el documento de patente 5 da a conocer un procedimiento para producir ácido láctico o etanol por fermentación continua utilizando una membrana de separación, mientras que el pH del líquido de cultivo se mantiene en 5, procedimiento que utiliza, como microorganismo de fermentación el ácido

láctico, la cepa NBRC 10505 de *Saccharomyces cerevisiae* en la que se introduce un gen de la lactato deshidrogenasa en el cromosoma o, como microorganismo de fermentación de etanol, la cepa NBRC 10505. En el procedimiento anterior, la producción continua de ácido láctico o etanol se lleva a cabo sin dejar la materia prima de fermentación, el azúcar, no utilizada.

Sin embargo, los inventores de la presente invención descubrieron otro problema que, en los casos en los que la fermentación continua utilizando una membrana de separación se lleva a cabo de la misma manera que en el documento de patente 5 en condiciones de pH bajo (a un pH de no más de 3,5), el consumo de azúcar se vuelve muy lento, y una gran cantidad de azúcar no se consume y permanece no utilizada. Si una gran cantidad de materia prima de fermentación, tal como azúcar, permanece no utilizada, el rendimiento del producto en relación con la materia prima de fermentación alimentada para la fermentación disminuye. En tal caso, el coste se ve afectado adversamente ya que, por ejemplo, el coste del producto aumenta, y la eliminación de la materia prima de fermentación en la etapa de purificación posterior es muy laboriosa.

MEDIOS PARA RESOLVER LOS PROBLEMAS.

Como resultado de un estudio intensivo, los inventores de la presente invención descubrieron que, en un procedimiento para producir un producto químico por fermentación continua utilizando una membrana de separación, el problema anterior puede resolverse utilizando una levadura que tenga resistencia a la vainillina, alcanzando así la presente invención.

Es decir, la presente invención es como se describe en de (1) a (5) a continuación.

(1) Un procedimiento para producir un producto químico, comprendiendo el procedimiento filtrar un líquido de cultivo de levadura resistente a la vainillina a través de una membrana de separación mientras se retiene o se refluye líquido sin filtrar en el líquido de cultivo, y añadir una materia prima de fermentación al líquido de cultivo, para realizar una fermentación continua en condiciones a pH de no más de 3,5, en el que, como la levadura, se utiliza la levadura cuyo líquido de cultivo obtenido en las siguientes condiciones (a) muestra una absorbancia a 600 nm de no menos del 20% de la absorbancia a 600 nm de un líquido de cultivo obtenido en las siguientes condiciones (b):

Condiciones (a): 40 horas de cultivo en medio YPAD complementado con vainillina (concentración final, 1 g/l) (absorbancia a 600 nm al comienzo del cultivo, 0,2);

Condiciones (b): cultivo en las mismas condiciones que en las condiciones (a), excepto que el medio YPAD no contiene vainillina.

(2) El procedimiento para producir un producto químico según (1), en el que como la levadura resistente a la vainillina, se utiliza levadura cuyo líquido de cultivo obtenido en las condiciones (a) muestra una absorbancia a 600 nm de no menos del 50% de la absorbancia a 600 nm de un líquido de cultivo obtenido en las condiciones (b).

(3) El procedimiento para producir un producto químico según (1) o (2), en el que como la levadura resistente a la vainillina, se utiliza la levadura cuyo líquido de cultivo obtenido en las siguientes condiciones (c) muestra una absorbancia a 600 nm de no menos del 20% de la absorbancia a 600 nm de un líquido de cultivo obtenido en las siguientes condiciones (d):

Condiciones (c): 40 horas de cultivo en medio YPAD complementado con acetona al 4% (v/v) (absorbancia a 600 nm al comienzo del cultivo, 0,2);

Condiciones (d): cultivo en las mismas condiciones que en las condiciones (c), excepto que el medio YPAD no contiene acetona.

(4) El procedimiento para producir un producto químico según cualquiera de (1) a (3), en el que la velocidad de alimentación de la materia prima de fermentación no es inferior a 4 g/(l·h).

(5) El procedimiento para producir un producto químico según cualquiera de (1) a (4), en el que el producto químico es un ácido orgánico o un alcohol.

EFFECTO DE LA INVENCION

Por la presente invención, un producto químico se puede producir de manera eficiente en fermentación continua utilizando una membrana de separación incluso en condiciones a un pH de no más de 3,5, sin dejar una gran cantidad de materia prima de fermentación no utilizada en el filtrado.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LOS DIBUJOS

La figura 1 muestra la concentración de azúcar restante en el líquido de cultivo durante el precultivo, y la concentración de azúcar restante en el filtrado desde el principio hasta la finalización de la fermentación continua utilizando una membrana de separación, en los ejemplos comparativos 1 a 3 y los ejemplos 1 a 3. La hora 0

representa el momento en que se inició la fermentación continua utilizando una membrana de separación, y el período anterior a la hora 0 corresponde al período de precultivo (durante 19 horas).

La figura 2 muestra la concentración de azúcar restante en el líquido de cultivo durante el precultivo, y la concentración de azúcar restante en el filtrado desde el principio hasta la finalización de la fermentación continua utilizando una membrana de separación, en los ejemplos 4 a 8. La hora 0 representa el momento en que se inició la fermentación continua utilizando una membrana de separación, y el período anterior a la hora 0 corresponde al período de precultivo (durante 19 horas).

MODO DE LLEVAR A CABO LA INVENCION

La levadura utilizada en la presente invención se describe a continuación.

La levadura utilizada en la presente invención que tiene resistencia a la vainillina (en lo sucesivo, levadura resistente a la vainillina) se caracteriza por que, como resultado de una prueba en la que la absorbancia de un líquido de cultivo obtenido en las siguientes condiciones (a) se compara con la absorbancia de un líquido de cultivo obtenido en las siguientes condiciones (b) (en adelante, el ensayo de resistencia a la vainillina), la absorbancia del líquido de cultivo obtenida en las condiciones (a) no es inferior al 20% de la absorbancia del líquido de cultivo obtenido en las condiciones (b). La relación es, preferentemente, no inferior al 30%, de forma más preferente no inferior al 40%, todavía de forma más preferente no inferior al 50%, todavía de forma más preferente no inferior al 60%, de forma especialmente preferente no inferior al 70%, de la forma más preferente no inferior al 80%.

Condiciones (a): 40 horas de cultivo en medio YPAD complementado con vainillina (concentración final, 1 g/l) (absorbancia a 600 nm al comienzo del cultivo, 0,2).

Condiciones (b): cultivo en las mismas condiciones que en las condiciones (a), excepto que el medio YPAD no contiene vainillina.

Por un mecanismo desconocido, una levadura resistente a la vainillina puede producir un producto químico incluso en fermentación continua utilizando una membrana de separación a un pH de no más de 3,5, sin dejar una gran cantidad de materia prima de fermentación no utilizada. "Dejar una gran cantidad de materia prima de fermentación no utilizada" significa un estado en el que la materia prima de fermentación no se ha consumido y permanece en el filtrado obtenido por filtración del líquido de cultivo a través de la membrana de separación. Si una gran cantidad de materia prima de fermentación permanece no utilizada en el filtrado, el rendimiento del producto en relación con la materia prima de fermentación alimentada para la fermentación disminuye. En tal caso, el coste del producto aumenta y, además, aumenta la carga de eliminación de la materia prima de fermentación en la purificación posterior. Por lo tanto, cuanto menor sea la cantidad de materia prima de fermentación que queda en el filtrado, mejor.

Las condiciones (a) y (b) en la prueba de resistencia a la vainillina se describen a continuación con detalle. En las condiciones (a) y (b), la absorbancia a 600 nm al comienzo del cultivo se ajusta a 0,2 (DO 600 nm = 0,2). Los ejemplos de su procedimiento incluyen, pero no se limitan a, un procedimiento en el que las células de levadura se cultivan por precultivo, y se mide la absorbancia del líquido de cultivo, seguido de un control de la cantidad de células que se van a inocular al líquido de cultivo principal, de modo que se logre una DO 600 nm = 0,2, y un procedimiento en el cual las células se hacen crecer en una placa de agar, y la cantidad de células a inocular de la placa de agar se controla de tal manera que se logre una DO 600 nm = 0,2.

Como medio para el cultivo en la prueba de resistencia a la vainillina, se utiliza medio YPAD. El medio YPAD utilizado en el presente documento es un medio que tiene la siguiente composición: extracto de levadura al 1% (p/v), bactopectona al 2% (p/v), glucosa al 2% (p/v) y adenina al 0,04% (p/v).

En la preparación del medio YPAD complementado con vainillina (concentración final, 1 g/l), que se utiliza en las condiciones (a), un concentrado de vainillina se añade preferentemente al medio YPAD esterilizado. El concentrado de vainillina se prepara preferentemente a de 100 a 200 g/l, más preferentemente se prepara a 200 g/l. Esto se debe a que la influencia del disolvente orgánico para disolver la vainillina en el crecimiento debe reducirse tanto como sea posible. Como disolvente orgánico para disolver la vainillina, se utiliza preferentemente DMSO. Por ejemplo, si se prepara un concentrado de vainillina (200 g/l), el medio YPAD complementado con vainillina se puede preparar añadiendo 25 µl del concentrado de vainillina a 5 ml de medio YPAD. En este contexto, al medio YPAD libre de vainillina, se añaden preferentemente 25 µl de DMSO solo. Esto se debe a que se debe tener en cuenta la influencia del DMSO sobre el crecimiento.

La levadura resistente a la vainillina utilizada en la presente invención también tiene resistencia a la acetona. En los casos en que se utiliza una levadura que tiene resistencia a la vainillina y también a la acetona, la materia prima de fermentación que permanece en el filtrado obtenido por fermentación continua utilizando una membrana de separación a un pH de no más de 3,5 se puede reducir aún más, de modo que es posible la producción más eficiente de un producto químico.

La levadura utilizada en la presente invención que tiene resistencia a la acetona (en lo sucesivo, levadura resistente

a la acetona) se caracteriza por que, como resultado de una prueba en la que se compara la absorbancia de un líquido de cultivo obtenido en las siguientes condiciones (c) con la absorbancia de un líquido de cultivo obtenido en las siguientes condiciones (d) (en adelante, prueba de resistencia a la acetona), la absorbancia del líquido de cultivo obtenida en las condiciones (c) no es inferior al 20% de la absorbancia del líquido de cultivo obtenido en las condiciones (d). La relación es, preferentemente, no inferior al 30%, más preferentemente no inferior al 40%, aún más preferentemente no inferior al 50%, aún más preferentemente no inferior al 60%, aún más preferentemente no inferior al 70%, aún más preferentemente no inferior al 80%. Condiciones (c): 40 horas de cultivo en medio YPAD complementado con acetona al 4% (v/v) (absorbancia a 600 nm al comienzo del cultivo, 0,2). Condiciones (d): cultivo en las mismas condiciones que en las condiciones (c), excepto que el medio YPAD no contiene acetona.

Las condiciones (c) y (d) en la prueba de resistencia a la acetona se describen a continuación con detalle. En las condiciones (c) y (d), la absorbancia a 600 nm al comienzo del cultivo se ajusta a 0,2 (DO 600 nm = 0,2).

Como el medio para el cultivo en la prueba de resistencia a la acetona, se utiliza el medio YPAD.

En la preparación del medio YPAD complementado con acetona al 4% (v/v), que se utiliza en las condiciones (c), la acetona se añade preferentemente al medio YPAD esterilizado.

Las temperaturas de cultivo para las condiciones (a) a (d) no están limitadas siempre que sea posible un crecimiento suficiente de las células de levadura. Las temperaturas de cultivo son, preferentemente, de 28 a 30°C, más preferentemente de 30°C.

El espectrofotómetro utilizado para medir las absorbancias de los líquidos de cultivo obtenidos en las condiciones (a) a (d) no está limitado. Sin embargo, el mismo espectrofotómetro debe utilizarse para las condiciones (a) a (d).

La levadura resistente a la vainillina (y la levadura resistente a la vainillina así como resistente a la acetona) utilizada en la presente invención puede seleccionarse mediante la detección selectiva mediante una prueba de resistencia a la vainillina (y una prueba de resistencia a la acetona) de cepas de levadura conocidas por los expertos en la materia. Ejemplos específicos de tal levadura incluyen la cepa NBRC 2260 de *Saccharomyces cerevisiae*, la cepa NBRC 272 de *Kluyveromyces marxianus*, la cepa NBRC 199 de *Candida tropicalis*, la cepa NBRC 10858 de *Lindnera fabianii*, la cepa NBRC 1253 de *Lindnera fabianii*, la cepa BCRC 21489 de *Candida melanosorbosa*, la cepa BCRC 21777 de *Pichia stipitis* y la cepa BCRC 22528 de *Candida boidinii*. Por supuesto, una levadura preparada sometiendo una levadura que no tiene resistencia a la vainillina (o resistencia a la acetona) a un tratamiento de mutación conocido por los expertos en la materia de manera tal que el resultado de una prueba de resistencia a la vainillina (o una prueba de resistencia a la acetona) no sea inferior al 20% también corresponde a la levadura resistente a la vainillina (o la levadura resistente a la vainillina así como resistente a la acetona) en la presente descripción.

El procedimiento para producir un producto químico por fermentación continua utilizando una membrana de separación se describe a continuación.

Como materia prima de fermentación que se utilizará en el procedimiento para producir un producto químico de la presente invención, se puede utilizar un medio natural o un medio sintético siempre que contenga una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, una sal inorgánica y/o similares, que la levadura puede metabolizar y siempre que permita un cultivo eficiente de la levadura. Más específicamente, en términos de la fuente de carbono, se prefiere utilizar, como uno o más componentes principales de la materia prima de fermentación, uno o más tipos de los llamados azúcares seleccionados del grupo que consiste en carbohidratos, tales como glucosa, fructosa, sacarosa, galactosa, maltosa, rafinosa, trehalosa, sorbosa, celobiosa, lactosa, melibiosa, melezitosa, inulina, xilosa, arabinosa, ribosa, ramnosa, glucosamina, eritritol, ribitol, manitol, glucitol, salicina, almidón y almidón e hidrolizados de los mismos; y líquidos sacarificados obtenidos de celulosa y similares derivados de biomasa. Fuentes de carbono, tales como ácidos orgánicos que incluyen ácido acético, ácido propiónico y ácido cítrico; y alcoholes, incluidos etanol y propanol, también se pueden utilizar como componentes principales de la materia prima de fermentación. Los ejemplos específicos de la fuente de nitrógeno que se pueden utilizar incluyen: amoníaco; sales de amonio de ácidos inorgánicos y ácidos orgánicos, tales como cloruro de amonio, sulfato de amonio, acetato de amonio y fosfato de amonio; otros compuestos que contienen nitrógeno; peptona; extractos de carne; y licores de maceración de maíz. Los ejemplos de la sustancia inorgánica que se puede utilizar incluyen dihidrogenofosfato de potasio, fosfato de magnesio, sulfato de magnesio, cloruro de sodio, sulfato ferroso, sulfato de manganeso, sulfato de cobre y carbonato de calcio. Estas fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno, sales inorgánicas y similares pueden añadirse de inmediato al inicio del cultivo, o pueden añadirse por separado o de manera continua durante el cultivo.

En los casos en que la levadura utilizada en la presente invención requiere un nutriente en particular para su crecimiento, el nutriente se puede añadir como una preparación o un producto natural que lo contenga. También se puede añadir un agente antiespumante según se requiera.

El líquido de cultivo en la presente invención significa un líquido obtenido como resultado del metabolismo de una materia prima de fermentación durante el crecimiento de un microorganismo. La composición de la materia prima de

fermentación que se va a añadir se puede cambiar según sea apropiado a partir de la composición de la materia prima de fermentación al comienzo del cultivo, de modo que aumente la producción del producto químico de interés.

5 En los casos en los que se utilizan uno o más azúcares como componente principal de la materia prima de fermentación, la concentración total de azúcar no está limitada, y, preferentemente, es lo más alta posible dentro del intervalo en el que la producción del producto químico por la levadura no se inhibe. Más específicamente, la concentración total de azúcar es, preferentemente, de 15 a 500 g/l, más preferentemente de 20 a 300 g/l.

10 La eficiencia de producción de un producto químico se puede evaluar en función del rendimiento del producto químico producido con respecto al componente principal de la materia prima de fermentación metabolizada por el microorganismo. En la presente descripción, el rendimiento se evalúa como el valor calculado según la siguiente ecuación (1).

15
$$\text{Rendimiento (g/g)} = \text{cantidad total de producto (g)} \div \{\text{cantidad total de materia prima de fermentación alimentada (g)} - \text{materia prima de fermentación no utilizada (g)}\} \times 100 \dots (\text{ecuación 1}).$$

20 La cantidad total de materia prima de fermentación alimentada en el presente documento representa la cantidad total del componente principal de la materia prima de fermentación alimentada para la fermentación, y la materia prima de fermentación no utilizada representa la cantidad total del componente principal de la materia prima de fermentación que no se ha consumido y permanece hasta la finalización de la fermentación. Más específicamente, en casos de fermentación discontinua, la materia prima de fermentación no utilizada representa el componente principal de la materia prima de fermentación que no ha sido metabolizada por el microorganismo y permanece en el líquido de cultivo hasta la finalización de la fermentación. En los casos de fermentación continua, la materia prima de fermentación no utilizada representa el componente principal de la materia prima de fermentación que permanece en el filtrado después de la filtración del líquido de cultivo a través de una membrana de separación. La cantidad total de producto es la cantidad total del producto químico producido (g).

30 La velocidad de alimentación de la materia prima de fermentación durante la fermentación continua no está limitada. La velocidad de alimentación es, preferentemente, no inferior a 4 g/(l·h). Esto se debe a que, en los casos en que la velocidad de alimentación de la materia prima de fermentación es inferior al esto, el efecto de la presente invención para suprimir el resto de la materia prima de fermentación puede deteriorarse. En este contexto, la velocidad de alimentación de la materia prima de fermentación se calcula según la siguiente ecuación (1).

35
$$\text{Velocidad de alimentación de la materia prima de fermentación (g/l·h)} = \text{concentración de la materia prima de fermentación en medio (g/l)} \times \text{velocidad de alimentación de la materia prima de fermentación en el fermentador (l/h)} \div \text{volumen de líquido operativo del aparato (l)} \dots (\text{ecuación 2}).$$

40 La membrana de separación utilizada en la presente invención no está limitada, siempre que tenga la función de separar, mediante filtración, un líquido de cultivo obtenido cultivando un microorganismo en un recipiente de cultivo agitado o un biorreactor agitado a partir del microorganismo. Los ejemplos de la membrana de separación incluyen membranas cerámicas porosas, membranas de vidrio porosas, membranas de polímeros orgánicos porosos, textiles de fibra metálica y telas no tejidas. Entre estos, se prefieren especialmente las membranas de polímeros orgánicos porosos y las membranas cerámicas.

45 La membrana de separación es, preferentemente, una membrana de separación que tiene una capa de resina porosa desde el punto de vista del rendimiento de bloqueo, la permeabilidad y el rendimiento de separación, por ejemplo, la resistencia a la suciedad.

50 La membrana de separación que tiene una capa de resina porosa tiene, preferentemente, una capa de resina porosa que actúa como una capa de función de separación, sobre una superficie de un material de base poroso. El material de base poroso soporta la capa de resina porosa para dar resistencia a la membrana de separación.

55 En los casos en los que la membrana de separación tiene una capa de resina porosa sobre una superficie de un material de base poroso, el material de base poroso puede estar impregnado con la capa de resina porosa, o puede no estar impregnado con la capa de resina porosa, dependiendo de la utilización.

El grosor promedio del material de base poroso es, preferentemente, de 50 μm a 3.000 μm.

60 El material de base poroso está compuesto de un material orgánico, material inorgánico y/o similares. Preferentemente se utiliza una fibra orgánica. El material de base poroso es, preferentemente, una tela tejida o tela no tejida compuesta de una fibra orgánica tal como una fibra de celulosa, fibra de acetato de celulosa, fibra de poliéster, fibra de polipropileno o fibra de polietileno. El material de base poroso es, más preferentemente, una tela no tejida ya que su densidad puede controlarse de manera relativamente fácil y puede producirse fácilmente.

65 Como capa de resina porosa, se puede utilizar favorablemente una membrana de polímero orgánico. Los ejemplos del material de la membrana de polímero orgánico 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 celulosa y resinas de triacetato de celulosa. La membrana de polímero orgánico también puede ser una mezcla de resinas que contienen dos o más de estas resinas como componentes principales. En este contexto, el componente principal significa que el componente está contenido en una cantidad de no menos del 50% en peso, preferentemente no menos del 60% en peso. El material de la membrana de polímero orgánico es, preferentemente, una resina de cloruro de polivinilo, resina de fluoruro de polivinilideno, resina de polisulfona, resina de polietersulfona o resina de poliacrilonitrilo. De la forma más preferente, se utiliza una resina de fluoruro de polivinilideno o una resina que lo contiene como un componente principal.

En este contexto, como la resina de fluoruro de polivinilideno, se utiliza preferentemente un homopolímero de fluoruro de vinilideno. La resina de fluoruro de polivinilideno también es, preferentemente, un copolímero con monómeros de vinilo capaces de copolimerizar con fluoruro de vinilideno. Los ejemplos de los monómeros de vinilo capaces de copolimerizar con fluoruro de vinilideno incluyen tetrafluoroetileno, hexafluoropropileno y cloruro de trifluoroetileno.

La membrana de separación no está limitada siempre que no permita el paso del microorganismo utilizado en la fermentación. Preferentemente, es menos probable que la membrana de separación se ensucie debido a las secreciones del microorganismo utilizado en la fermentación y las partículas finas en la materia prima de fermentación, y mantiene estable su rendimiento de filtración durante un largo tiempo. Por lo tanto, el tamaño de poro promedio de la membrana de separación es, preferentemente, no inferior a 0,01 μm e inferior a 5 μm . En los casos en que el tamaño promedio de los poros de la membrana de separación no sea inferior a 0,01 μm e inferior a 1 μm , se puede lograr una alta tasa de bloqueo que no permite la fuga del microorganismo y se puede lograr una alta permeabilidad, y la permeabilidad se puede mantener con alta precisión y reproducibilidad durante mucho tiempo.

El tamaño de poro promedio de la membrana de separación es, preferentemente, inferior a 1 μm , ya que, en los casos en que el tamaño de poro promedio está cerca del tamaño del microorganismo, los poros pueden estar directamente obstruidos con el microorganismo. Desde el punto de vista de prevenir la fuga del microorganismo, es decir, evitar que ocurra un problema que cause una disminución en la tasa de eliminación, el tamaño de poro promedio de la membrana de separación preferentemente no es demasiado grande en relación con el tamaño del microorganismo. En los casos en que se utilizan células pequeñas, tales como células bacterianas, como microorganismo, el tamaño promedio de los poros es, preferentemente, de no más de 0,4 μm . La filtración se puede llevar a cabo de manera más favorable en los casos en que el tamaño promedio de los poros es inferior a 0,2 μm .

En algunos casos, el microorganismo produce sustancias distintas al producto químico deseado, tales como las proteínas y los polisacáridos que son propensos a la agregación, y también hay casos en que los desechos celulares se producen por la muerte de una parte del microorganismo en el líquido del cultivo de fermentación. Para evitar la obstrucción de la membrana de separación con tales sustancias, el tamaño promedio de los poros es, aún más preferentemente, de no más de 0,1 μm .

En los casos en que el tamaño de poro promedio de la membrana de separación es demasiado pequeño, la permeabilidad de la membrana de separación puede ser baja, por lo que su funcionamiento eficiente es imposible incluso sin el ensuciamiento de la membrana. Por lo tanto, el tamaño de poro promedio de la membrana de separación es, preferentemente, no inferior a 0,01 μm , más preferentemente no inferior a 0,02 μm , aún más preferentemente no inferior a 0,04 μm .

En este contexto, el tamaño promedio de los poros se puede determinar midiendo los diámetros de todos los poros que se pueden observar dentro de un área de 9,2 $\mu\text{m} \times 10,4 \mu\text{m}$ bajo el microscopio electrónico de barrido con un aumento de 10.000 $\times$, y promediando los valores medidos. Alternativamente, el tamaño promedio de los poros se puede determinar tomando una imagen de la superficie de la membrana utilizando un microscopio electrónico de barrido con un aumento de 10.000 $\times$, y seleccionando al azar no menos de 10, preferentemente no menos de 20 poros, seguido de la medición del diámetro de estos poros y cálculo del promedio numérico. En los casos en que un poro no es circular, un círculo que tiene la misma área que la del poro (círculo equivalente) puede determinarse utilizando un dispositivo de procesamiento de imágenes o similar, y el diámetro del círculo equivalente puede considerarse como el diámetro del poro.

La desviación estándar σ del tamaño de poro promedio de la membrana de separación es, preferentemente, de no más de 0,1 μm . Cuanto menor sea la desviación estándar σ del tamaño de poro promedio, mejor. La desviación estándar σ del tamaño de poro promedio se calcula según lo siguiente (ecuación 3), en la que N representa el número de poros observables dentro del área mencionada anteriormente de 9,2 $\mu\text{m} \times 10,4 \mu\text{m}$; X_k representa los respectivos diámetros medidos; y $\bar{X}$ (prom) representa el promedio de los tamaños de poro.

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{k=1}^N (X_k - X(\text{prom}))^2}{N}} \quad \dots \quad (\text{ecuación 3})$$

En la membrana de separación utilizada en la presente invención, la permeabilidad al líquido de cultivo de fermentación es una de sus propiedades importantes. Como un índice para la permeabilidad de la membrana de separación, se puede utilizar el coeficiente de permeabilidad al agua pura de la membrana de separación antes de la utilización. El coeficiente de permeabilidad al agua pura de la membrana de separación es, preferentemente, de no menos de $5,6 \times 10^{-10} \text{ m}^3/\text{m}^2/\text{s}/\text{pa}$ calculada cuando la cantidad de permeación se mide a una temperatura de 25°C con una diferencia de altura de cabeza de 1 m utilizando agua purificada preparada por filtración a través de una membrana de ósmosis inversa. En los casos en que el coeficiente de permeabilidad del agua pura es de $5,6 \times 10^{-10} \text{ m}^3/\text{m}^2/\text{s}/\text{pa}$ a $6 \times 10^{-7} \text{ m}^3/\text{m}^2/\text{s}/\text{pa}$, se puede obtener una cantidad de permeación que sea prácticamente suficiente.

La rugosidad de la superficie de la membrana de la membrana de separación utilizada en la presente invención es la altura media en la dirección vertical desde la superficie. La rugosidad de la superficie de la membrana es un factor que permite un fácil desprendimiento del microorganismo que se adhiere a la superficie de la membrana de separación, por el efecto de lavado de la superficie de la membrana de una corriente líquida producida por agitación o una bomba de circulación. La rugosidad de la superficie de la membrana de separación no está limitada, siempre y cuando el microorganismo y otros sólidos que se adhieran a la membrana puedan desprenderse. La rugosidad de la superficie es, preferentemente, de no más de 0,1 μm . En los casos en que la rugosidad de la superficie no supere los 0,1 μm , el microorganismo y otros sólidos que se adhieren a la membrana se pueden desprender fácilmente.

La membrana de separación tiene, más preferentemente, una rugosidad superficial de no más de 0,1 μm , un tamaño de poro promedio de no menos de 0,01 μm y menos de 1 μm , y un coeficiente de permeabilidad al agua pura de no menos de $2 \times 10^{-9} \text{ m}^3/\text{m}^2/\text{s}/\text{pa}$. Se descubrió que, mediante la utilización de una membrana de este tipo, la operación se puede realizar más fácilmente sin requerir una potencia excesiva para lavar la superficie de la membrana. En los casos en los que la rugosidad de la superficie de la membrana no sea superior a 0,1 μm , la fuerza de corte generada en la superficie de la membrana durante la filtración del microorganismo se puede reducir, y por lo tanto se puede suprimir la destrucción del microorganismo, por lo que se puede evitar el ensuciamiento de la membrana de separación. Por lo tanto, la filtración estable se puede llevar a cabo más fácilmente durante mucho tiempo. En los casos en que la rugosidad de la superficie de la membrana de la membrana de separación no sea superior a 0,1 μm , la fermentación continua se puede llevar a cabo con una diferencia de presión transmembrana más pequeña, e incluso en los casos en los que se produjo el ensuciamiento de la membrana de separación, la membrana puede recuperarse más fácilmente por lavado en comparación con los casos en que la operación se llevó a cabo con una gran diferencia de presión transmembrana. Dado que la fermentación continua estable es posible al suprimir el ensuciamiento de la membrana de separación, la rugosidad de la superficie de la membrana de separación es, preferentemente, lo más pequeña posible.

En este contexto, la rugosidad de la superficie de la membrana de la membrana de separación se mide utilizando el siguiente microscopio de fuerza atómica (AFM) en las siguientes condiciones.

- Aparato

Aparato de microscopio de fuerza atómica ("Nanoscope IIIa", fabricado por Digital Instruments)

- Condiciones

Sonda: SiN cantilever (fabricado por Digital Instruments)
 Modo de barrido: modo de contacto (medición en aire)
 Modo de toma bajo el agua (medición bajo el agua)
 Área de barrido: 10 $\mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$, 25 $\mu\text{m} \times 25 \mu\text{m}$ (medición en aire)
 5 $\mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$, 10 $\mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$ (medición bajo el agua)
 Resolución de barrido: 512 $\times$ 512

- Preparación de la muestra

Para la medición, la muestra de membrana se empapó en etanol a temperatura ambiente durante 15 minutos, y

luego se empapó en agua obtenida por ósmosis inversa durante 24 horas, seguido de un lavado y secado al aire. El agua obtenida por ósmosis inversa significa agua preparada por filtración a través de una membrana de ósmosis inversa (membrana RO), que es una membrana de separación, para eliminar las impurezas como los iones y las sales. El tamaño de los poros de la membrana de RO no es más de aproximadamente 2 nm.

La rugosidad de la superficie de la membrana, $d_{\text{rugosidad}}$, se calcula según lo siguiente (ecuación 4) utilizando el aparato de microscopio de fuerza atómica (AFM) anterior, basado en las alturas de los puntos respectivos en la dirección del eje z.

$$d_{\text{rugosidad}} = \sum_{n=1}^N \frac{|Z_n - \bar{Z}|}{N} \quad \dots \quad (\text{ecuación 4})$$

$d_{\text{rugosidad}}$: Rugosidad promedio de la superficie (μm)

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

$\bar{Z}$: Altura promedio en el área de barrido (μm)

La membrana de separación tiene, preferentemente, la forma de una membrana plana. En los casos en que la membrana de separación tenga la forma de una membrana plana, su grosor promedio se selecciona según la utilización. En los casos en que la membrana de separación tiene la forma de una membrana plana, su grosor promedio es, preferentemente, de 20 μm a 5.000 μm , más preferentemente de 50 μm a 2.000 μm .

Alternativamente, la membrana de separación tiene, preferentemente, la forma de una membrana de fibra hueca. En los casos en que la membrana de separación es una membrana de fibra hueca, el diámetro interior de la fibra hueca es, preferentemente, de 200 μm a 5.000 μm , y el grosor de la membrana es, preferentemente, de 20 μm a 2.000 μm . Una tela o un tejido producido mediante la formación de una fibra orgánica o una fibra inorgánica en una forma cilíndrica puede estar contenido en la fibra hueca.

La membrana de separación mencionada anteriormente se puede producir, por ejemplo, mediante el procedimiento de producción descrito en el documento WO 2007/097260.

En otro modo preferente, la membrana de separación en la presente invención puede ser una membrana que contiene al menos una cerámica. La cerámica en la presente invención significa una cerámica que contiene un óxido metálico y se sinteriza por tratamiento térmico a alta temperatura. Los ejemplos del óxido metálico incluyen alúmina, magnesia, titania y circonia. La membrana de separación puede formarse con el óxido metálico solo, o puede contener sílice; carburo de silicio; y/o un compuesto de sílice y uno o más óxidos metálicos, tales como mullita o cordierita.

Los componentes distintos de la cerámica que forman la membrana de separación no están limitados, siempre que permitan la formación de un cuerpo poroso como la membrana de separación.

También en los casos en que la membrana de separación contiene una cerámica, la forma de la membrana de separación no está limitada, y se puede emplear cualquiera de, por ejemplo, membranas monolíticas, membranas planas y membranas tubulares. Desde el punto de vista del llenado eficiente en un recipiente, la membrana de separación tiene preferentemente una estructura columnar en la que se forman orificios de penetración en la dirección longitudinal. Desde el punto de vista de aumentar la eficiencia de llenado, la membrana de separación es, preferentemente, una membrana monolítica.

La razón por la que los orificios de penetración se forman, preferentemente, en la dirección longitudinal es la siguiente. En los casos en que una membrana de separación que tiene una forma columnar se coloca en un recipiente de módulo para proporcionar un módulo de membrana de separación, un modo preferente de la membrana de separación se puede seleccionar entre membranas de tipo de presión externa y membranas de tipo de presión interna, y la membrana de separación en este modo se puede utilizar para proporcionar el módulo que se utilizará para la filtración. En la presente invención, el lado de la membrana de separación que entra en contacto con el líquido de cultivo de fermentación se denomina de en el presente documento en adelante el lado primario, y el lado en el que el filtrado que contiene un producto químico se obtiene mediante la filtración se denomina de en el presente documento en adelante el lado secundario.

En los casos en que se utiliza un módulo de tipo de presión interna, el canal del lado primario es estrecho, de modo

que la salida de la bomba de circulación se puede guardar cuando se realiza la filtración de flujo cruzado. Además, dado que la acción para descargar la materia suspendida depositada sobre la superficie de la membrana de separación aumenta, es probable que la superficie de la membrana de separación se mantenga limpia, lo que es preferente. Sin embargo, para obtener su efecto, la membrana de separación del tipo de presión interna debe tener una entrada y una salida para el líquido de cultivo de fermentación. En los casos en que la entrada y la salida están en el estado de orificios de penetración que están dispuestos linealmente, la resistencia al flujo se puede reducir, lo que es preferente. En los casos en que la membrana de separación tiene una estructura columnar en la que los orificios de penetración estén abiertos en la dirección longitudinal, se puede utilizar un recipiente delgado para contener la membrana de separación. Se puede utilizar favorablemente un módulo de membrana de separación delgada desde el punto de vista de su producción y facilidad de manejo.

Aunque la porosidad de la membrana de separación no está limitada, una baja porosidad conduce a una baja eficiencia de filtración, mientras que una alta porosidad conduce a una baja resistencia. Con el fin de lograr tanto una eficiencia de filtración favorable como una resistencia favorable de la membrana de separación, y para dar resistencia a la esterilización por vapor repetida, la porosidad es, preferentemente, del 20% al 60%.

La porosidad se determina según lo siguiente (ecuación 5).

$$\text{Porosidad [\%]} = 100 \times (\text{peso de la membrana en húmedo [g]} - \text{peso de la membrana en seco [g]}) / \text{densidad relativa del agua [g/cm}^3\text{]} / \text{volumen de la membrana [cm}^3\text{]} \dots (\text{ecuación 5}).$$

El tamaño de poro promedio de la membrana de separación es, preferentemente, de 0,01 µm a 1 µm. En los casos en que la membrana tiene un tamaño de poro promedio dentro de este intervalo, es menos probable que se produzca una obstrucción de la membrana de separación, y se puede lograr una excelente eficiencia de filtración. En los casos en que el tamaño promedio de los poros está dentro del intervalo de 0,02 µm a 0,2 µm, las sustancias que a menudo causan la obstrucción de la membrana de separación, por ejemplo, los subproductos de la fermentación por el microorganismo o las células cultivadas tales como las proteínas y los polisacáridos, y los restos celulares producidos por la muerte del microorganismo/células cultivadas en el líquido de cultivo, tienen menos probabilidades de causar obstrucciones, lo cual es especialmente preferente.

En una membrana de separación con forma de columna en la que se forman orificios de penetración, la superficie exterior corresponde al lado secundario. Por lo tanto, dicha membrana de separación se utiliza, preferentemente, como un módulo en el que se proporciona un recipiente de módulo para recoger el filtrado, y el recipiente de módulo se carga con la membrana de separación. Una o más membranas de separación se colocan en un módulo.

El recipiente de módulo está compuesto, preferentemente, de un material que es resistente al tratamiento repetido de esterilización por vapor. Los ejemplos de material resistente al tratamiento de esterilización por vapor incluyen los aceros inoxidables y las cerámicas con porosidades promedio bajas.

Dicho módulo de membrana de cerámica se puede producir por el procedimiento de producción descrito en el documento WO2012/086763. Alternativamente, puede utilizarse un producto disponible en el mercado. Los ejemplos específicos del producto disponible en el mercado incluyen una membrana de microfiltración MEMBRALOX (Pall) y una membrana de filtro cerámico Cefilt MF (NGK Insulators, Ltd.).

La fermentación continua en la presente invención se caracteriza porque un líquido de cultivo de levadura se filtra a través de una membrana de separación mientras que el líquido no filtrado se retiene o se refluye en el líquido de cultivo; se añade una materia prima de fermentación al líquido de cultivo; y el producto se recupera del filtrado.

La diferencia de presión transmembrana durante la filtración a través de la membrana de separación no está limitada siempre que la filtración del líquido de cultivo de fermentación sea posible. Sin embargo, en los casos en que el tratamiento de filtración para filtrar el líquido de cultivo se realiza utilizando una membrana de polímero orgánico con una diferencia de presión transmembrana de más de 150 kPa, es probable que la estructura de la membrana de polímero orgánico se destruya, y esto puede llevar a una baja capacidad para producir el producto químico. Por otro lado, con una diferencia de presión transmembrana tan baja como menos de 0,1 kPa, la cantidad de permeación del líquido de cultivo de fermentación a menudo es insuficiente, por lo que la productividad en la producción del producto químico tiende a ser baja. Por lo tanto, en el procedimiento para producir un producto químico de la presente invención, en casos de una membrana de polímero orgánico, la diferencia de presión transmembrana como la presión de filtración está, preferentemente, dentro del intervalo de 0,1 kPa a 150 kPa. En tales condiciones, la cantidad de permeación del líquido del cultivo de fermentación es grande, y no se reduce la capacidad de producir el producto químico debido a la destrucción de la estructura de la membrana, por lo que la capacidad de producir el producto químico se puede mantener alta. En las membranas de polímeros orgánicos, la diferencia de presión transmembrana está, preferentemente, dentro del intervalo de 0,1 kPa a 50 kPa, más preferentemente dentro del intervalo de 0,1 kPa a 20 kPa.

La temperatura durante la fermentación por la levadura puede ser una temperatura adecuada para la levadura utilizada, y no está limitada siempre que se encuentre dentro del intervalo en el que el microorganismo puede crecer.

La fermentación se realiza a una temperatura dentro del intervalo de 20 a 75°C.

El pH del líquido de cultivo durante la fermentación continua se ajusta a no más de 3,5. El pH del líquido de cultivo se ajusta de antemano con un ácido inorgánico u orgánico, una sustancia alcalina, urea, carbonato de calcio, gas amoníaco o similares para un pH predeterminado de no más de 3,5.

En el procedimiento para producir un producto químico de la presente invención, el cultivo discontinuo o el cultivo semidiscontinuo se puede llevar a cabo en la fase inicial del cultivo para aumentar la concentración del microorganismo y, después de esto, el cultivo continuo (filtración del líquido de cultivo) puede iniciarse. Alternativamente, las células microbianas en alta concentración pueden sembrarse y el cultivo continuo puede comenzar al comienzo del cultivo. En el procedimiento de la presente invención para producir un producto químico, es posible comenzar el suministro del medio y la filtración del líquido de cultivo en tiempos apropiados. Los tiempos para iniciar el suministro del medio y para iniciar la filtración del líquido de cultivo no necesariamente tienen que ser los mismos. El suministro del medio y la filtración del líquido de cultivo pueden llevarse a cabo de forma continua o intermitente.

La concentración del microorganismo en el líquido de cultivo se mantiene, preferentemente, de modo que la productividad del producto químico sea alta, desde el punto de vista de obtener una productividad eficiente. Por ejemplo, en los casos en que la concentración del microorganismo en el líquido de cultivo se mantiene a no menos de 5 g/l en términos de peso seco, se puede obtener una eficiencia de producción favorable.

Si es necesario, durante la fermentación continua, una parte del líquido de cultivo que contiene el microorganismo se puede eliminar del fermentador, y el líquido de cultivo se puede diluir con un medio para controlar la concentración del microorganismo en el fermentador. Por ejemplo, dado que si la concentración de las células microbianas en el fermentador es demasiado alta, es probable que se produzca una obstrucción de la membrana de separación, la obstrucción se puede evitar en algunos casos eliminando una parte del líquido de cultivo que contiene el microorganismo y diluyendo el líquido de cultivo con un medio. Dado que el rendimiento para producir el producto químico puede variar dependiendo de la concentración del microorganismo en el fermentador, el rendimiento productivo se puede mantener utilizando el rendimiento productivo como un índice para la eliminación de una parte del líquido de cultivo que contiene el microorganismo y la dilución del líquido de cultivo con un medio.

En el procedimiento para producir un producto químico de la presente invención, el número de fermentadores no está limitado, siempre que el procedimiento sea un cultivo continuo que produce el producto mientras permite el crecimiento de células microbianas.

El aparato de fermentación continua no está limitado, siempre que sea un aparato para la producción de un producto químico por fermentación continua en el que se filtre un líquido de cultivo de fermentación de levadura a través de una membrana de separación para recuperar el producto del filtrado, mientras que se retiene o se refluye el líquido sin filtrar en el líquido de cultivo de fermentación; se añade una materia prima de fermentación al líquido de cultivo de fermentación; y se recupera el producto en el filtrado. En los casos en que se utiliza una membrana de polímero orgánico, los ejemplos específicos del aparato de fermentación continua incluyen el aparato descrito en el documento WO 2007/097260.

El producto químico producido por la presente invención no está limitado siempre que sea un producto químico que pueda ser producido por una levadura conocida por los expertos en la materia (incluidas las levaduras sometidas a tratamiento de mutación o recombinación genética). Los ejemplos preferentes del producto químico incluyen ácidos orgánicos y alcoholes. Los ejemplos específicos de los ácidos orgánicos incluyen ácido acético, ácido láctico, ácido adípico, ácido pirúvico, ácido succínico, ácido málico, ácido itacónico y ácido cítrico. Los ejemplos específicos de los alcoholes incluyen etanol, 1,3-propanodiol, 1,3-butanodiol, 2,3-butanodiol, 1,4-butanodiol, glicerol, butanol, isobutanol, 2-butanol e isopropanol. Estos productos químicos se recuperan del filtrado mediante uno o más procedimientos conocidos (separación por membrana, concentración, destilación, cristalización, extracción y/o similares).

EJEMPLOS

La presente invención se describe a continuación más concretamente por medio de ejemplos.

Ejemplos

(Ejemplo de referencia 1) Procedimiento para analizar la glucosa y el etanol

Las concentraciones de glucosa y etanol en el líquido de cultivo se cuantificaron en las condiciones de HPLC que se describen a continuación, según la comparación con muestras estándar.

Columna: Shodex SH1011 (fabricada por Showa Denko K. K.)
Fase móvil: ácido sulfúrico 5 mM (caudal, 0,6 ml/minuto)

Solución de reacción: ninguna.
Procedimiento de detección: RI (índice de refracción diferencial)
Temperatura: 65°C

5 (Ejemplo de referencia 2) Procedimiento para analizar el ácido láctico

El ácido láctico en el líquido de fermentación se cuantificó en las condiciones de HPLC que se describen a continuación según la comparación con muestras estándar.

10 Columna: Shim-Pack SPR-H (fabricada por Shimadzu Corporation)
Fase móvil: ácido *p*-toluenosulfónico 5 mM (caudal, 0,8 ml/min.)
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 (Ejemplo de referencia 3) Introducción del gen de la D-lactato deshidrogenasa en el locus PDC1 en la cepa NBRC 10505 de *Saccharomyces cerevisiae*

20 Como el gen de la D-lactato deshidrogenasa (D-LDH), se utilizó uno derivado de *Limulus polyphemus* (véase el documento WO 2010/140602). Los ejemplos del procedimiento para insertar ADN que contiene el gen D-LDH en la secuencia descendente del promotor para el gen PDC1 en el cromosoma mediante recombinación homóloga incluyen, entre otros, un procedimiento en el que la PCR se lleva a cabo utilizando cebadores para la secuencia ascendente y descendente del ADN que contiene el gen D-LDH, cebadores que están diseñados de manera que se añaden porciones homólogas al sitio diana de introducción, y el fragmento de PCR resultante se utiliza para la
25 transformación de la levadura. Para la selección simple de transformantes, el fragmento de PCR contiene, preferentemente, un marcador de selección de levadura tal como un gen de aminoácido sintetasa o un gen de resistencia a fármacos.

30 La transformación se llevó a cabo mediante el procedimiento del acetato de litio utilizando el "Sistema de transformación de levadura YEASTMAKER" (fabricado por CLONETECH). Para detalles de la operación, se siguieron las instrucciones del fabricante. La cepa NBRC 10505 de *Saccharomyces cerevisiae* como huésped es una cepa que carece de la capacidad de sintetizar triptófano y, por la acción del gen TRP1, los transformantes en los que se introduce el gen se pueden seleccionar en un medio sin triptófano.

35 La introducción del gen D-LDH en los transformantes así obtenidos se confirmó extrayendo ADN genómico que contiene ADN plasmídico de los transformantes cultivados en medio YPAD utilizando un kit de extracción de ADN genómico "Dr. GenTLE" (fabricado por TAKARA BIO INC.), y, a continuación, realizando la PCR con el ADN extraído como molde utilizando "PreMix Taq" (fabricado por TAKARA BIO INC.). Como resultado, se podría confirmar que todos los transformantes tienen el gen de la D-LDH insertado en el locus PDC1.

40 La cepa NBRC 10505 de *Saccharomyces cerevisiae* que tiene la D-LDH derivado de *Limulus polyphemus* en el locus PDC1, obtenida en el proceso anterior, en lo sucesivo se denomina la cepa NBRC 10505/ Δ PDC1::LDH.

45 (Ejemplo de referencia 4) Introducción del gen de la D-lactato deshidrogenasa en el locus PDC1 en la cepa NBRC 2260 de *Saccharomyces cerevisiae*

50 Como el gen de la D-lactato deshidrogenasa (D-LDH), se utilizó uno derivado de *Limulus polyphemus* (véase el documento WO 2010/140602). La cepa NBRC 2260 de *Saccharomyces cerevisiae* que se utilizará como huésped es una cepa sin auxotrofia de aminoácidos. Al utilizar un gen de resistencia contra un medicamento tal como Geneticina (G418) o higromicina, los transformantes en los que se introduce el gen de la D-LDH se pueden seleccionar en un medio complementado con el fármaco. Utilizando G418 como marcador de selección, la transformación se llevó a cabo mediante el mismo procedimiento que en el ejemplo de referencia 3. Para los transformantes obtenidos, la introducción del gen de la D-LDH se confirmó mediante el mismo procedimiento que en el ejemplo de referencia 3. Como resultado, se podría confirmar que todos los transformantes tienen el gen de la D-LDH insertado en el locus
55 PDC1.

La cepa NBRC 2260 de *Saccharomyces cerevisiae* que tiene la D-LDH derivado de *Limulus polyphemus* en el locus PDC1, obtenida en el proceso anterior, en lo sucesivo denomina como la cepa NBRC 2260/ Δ PDC1::LDH.

60 (Ejemplo de referencia 5) Prueba de resistencia a la vainillina y prueba de resistencia a la acetona de la cepa NBRC 10505 de *Saccharomyces cerevisiae*

[Prueba de resistencia a la vainillina]

65 La cepa NBRC 10505 de *Saccharomyces cerevisiae* se inoculó utilizando un asa de siembra de platino en tubos de ensayo de 20 ml, cada uno de los cuales contenía 5 ml de medio YPAD, y luego se cultivó con agitación a 30°C

durante una noche (precultivo). El medio YPAD tenía la siguiente composición: extracto de levadura al 1% (p/v), bactopectona al 2% (p/v), glucosa al 2% (p/v) y adenina al 0,04% (p/v). Se preparó un concentrado de vainillina (200 g/l en DMSO) y se añadieron 25 µl del concentrado de vainillina a 5 ml de medio YPAD, de modo que la concentración final se convirtió en 1 g/l. Para proporcionar medio YPAD libre de vainillina, se añadieron 25 µl de DMSO solo al medio YPAD. El líquido de precultivo se inoculó en el medio YPAD (con vainillina) y el medio YPAD libre de vainillina de manera que la DO se convirtió en 0,2, y el cultivo se realizó a 30°C durante 40 horas. Después del cultivo, se midió la DO 600 nm del líquido de cultivo de cada cepa y se calculó un valor según lo siguiente (ecuación 5). El valor calculado se muestra en la tabla 1.

10
$$\text{Absorbancia a 600 nm del medio YPAD (con vainillina)} \div \text{absorbancia a 600 nm de medio YPAD} \times 100 \dots (\text{ecuación 6}).$$

Como resultado, se descubrió que la cepa NBRC 10505 de *Saccharomyces cerevisiae* era una levadura que no tenía resistencia a la vainillina.

15 [Prueba de resistencia a la acetona]

La cepa NBRC 10505 de *Saccharomyces cerevisiae* se inoculó utilizando un asa de platino en tubos de ensayo de 20 ml, cada uno de los cuales contenía 5 ml de medio YPAD, y luego se cultivó con agitación a 30°C durante una noche (precultivo). El medio YPAD tenía la siguiente composición: extracto de levadura al 1% (p/v), bactopectona al 2% (p/v), glucosa al 2% (p/v) y adenina al 0,04% (p/v). A 5 ml de medio YPAD, se añadieron 200 µl de acetona, de modo que la concentración final se convirtió en 4% (v/v). El líquido de precultivo se inoculó en el medio YPAD (con acetona) y en el medio YPAD sin acetona, de manera que la DO 600 nm se convirtió en 0,2, y el cultivo se realizó a 30°C durante 40 horas. Después del cultivo, se midió la DO 600 nm del líquido de cultivo de cada cepa y se calculó un valor según lo siguiente (ecuación 6). El valor calculado se muestra en la tabla 1.

$$\text{Absorbancia a 600 nm del medio YPAD (con acetona)} \div \text{absorbancia a 600 nm de medio YPAD} \times 100 \dots (\text{ecuación 7}).$$

30 Como resultado, se descubrió que la cepa NBRC 10505 de *Saccharomyces cerevisiae* era una levadura que no tenía resistencia a la acetona.

(Ejemplo de referencia 6) Prueba de resistencia a la vainillina y prueba de resistencia a la acetona de la cepa NBRC 10307 de *Candida pignaliae*

35 La cepa NBRC 10307 de *Candida pignaliae* se puso a prueba mediante el mismo procedimiento que en el ejemplo de referencia 5, y los valores se calcularon según (ecuación 6) y (ecuación 7) (tabla 1). Como resultado, se descubrió que la cepa NBRC 10307 de *Candida pignaliae* es una levadura que no tiene resistencia a la vainillina ni a la acetona.

40 (Ejemplo de referencia 7) Prueba de resistencia a la vainillina de la cepa NBRC 10320 de *Pichia mexicana*

La cepa NBRC 10320 de *Pichia mexicana* se puso a prueba mediante el mismo procedimiento que en el ejemplo de referencia 5, y los valores se calcularon según (ecuación 6) y (ecuación 7) (tabla 1). Como resultado, se descubrió que la cepa NBRC 10320 de *Pichia mexicana* no era una levadura resistente a la vainillina, pero se descubrió que era una levadura resistente a la acetona.

(Ejemplo de referencia 8) Prueba de resistencia a la vainillina y prueba de resistencia a la acetona de la cepa NBRC 2260 de *Saccharomyces cerevisiae*

50 La cepa NBRC 2260 de *Saccharomyces cerevisiae* se puso a prueba mediante el mismo procedimiento que en el ejemplo de referencia 5, y los valores se calcularon según (ecuación 6) y (ecuación 7) (tabla 1). Como resultado, se descubrió que la cepa NBRC 2260 de *Saccharomyces cerevisiae* es una levadura resistente a la vainillina y también a la acetona.

55 (Ejemplo de referencia 9) Prueba de resistencia a la vainillina y prueba de resistencia a la acetona de la cepa NBRC 272 de *Kluyveromyces marxianus*

La cepa NBRC 272 de *Kluyveromyces marxianus* se puso a prueba mediante el mismo procedimiento que en el ejemplo de referencia 5, y los valores se calcularon según (ecuación 6) y (ecuación 7) (tabla 1). Como resultado, se descubrió que la cepa NBRC 272 de *Kluyveromyces marxianus* es una levadura resistente a la vainillina y también a la acetona.

65 (Ejemplo de referencia 10) Prueba de resistencia a la vainillina y prueba de resistencia a la acetona de la cepa NBRC 199 de *Candida tropicalis*

La cepa NBRC 199 de *Candida tropicalis* se puso a prueba mediante el mismo procedimiento que en el ejemplo de referencia 5, y los valores se calcularon según (ecuación 6) y (ecuación 7) (tabla 1). Como resultado, se descubrió que la cepa NBRC 199 de *Candida tropicalis* es una levadura resistente a la vainillina y también a la acetona.

5 (Ejemplo de referencia 11) Prueba de resistencia a la vainillina y prueba de resistencia a la acetona de la cepa NBRC 10858 de *Lindnera meyeræ*

10 La cepa NBRC 10858 de *Lindnera meyeræ* se puso a prueba mediante el mismo procedimiento que en el ejemplo de referencia 5, y los valores se calcularon según (ecuación 6) y (ecuación 7) (tabla 1). Como resultado, se descubrió que la cepa NBRC 10858 de *Lindnera meyeræ* es una levadura resistente a la vainillina y también a la acetona.

15 (Ejemplo de referencia 12) Prueba de resistencia a la vainillina y prueba de resistencia a la acetona de la cepa NBRC 1253 de *Lindnera fabianii*

La cepa NBRC 1253 de *Lindnera fabianii* se puso a prueba mediante el mismo procedimiento que en el ejemplo de referencia 5 y se calculó un valor según (ecuación 5) (tabla 1). Como resultado, se descubrió que la cepa NBRC 1253 de *Lindnera fabianii* es una levadura resistente a la vainillina y también a la acetona.

20 (Ejemplo de referencia 13) Prueba de resistencia a la vainillina y prueba de resistencia a la acetona de la cepa BCRC 21489 de *Candida methanosorbosaa*

25 La cepa BCRC 21489 de *Candida methanosorbosa* se puso a prueba mediante el mismo procedimiento que en el ejemplo de referencia 5 y los valores se calcularon según (ecuación 6) y (ecuación 7) (tabla 1). Como resultado, se descubrió que la cepa BCRC 21489 de *Candida methanosorbosa* es una levadura resistente a la vainillina así como resistente a la acetona.

30 (Ejemplo de referencia 14) Prueba de resistencia a la vainillina y prueba de resistencia a la acetona de la cepa BCRC 21777 de *Pichia stipitis*

La cepa BCRC 21777 de *Pichia stipitis* se puso a prueba mediante el mismo procedimiento que en el ejemplo de referencia 5 y los valores se calcularon según (ecuación 6) y (ecuación 7) (tabla 1). Como resultado, se descubrió que la cepa BCRC 21777 de *Pichia stipitis* es una levadura resistente a la vainillina, pero se descubrió que no es una levadura resistente a la acetona.

35 (Ejemplo de referencia 15) Prueba de resistencia a la vainillina y prueba de resistencia a la acetona de la cepa BCRC 22528 de *Candida boidinii*

40 La cepa BCRC 22528 de *Candida boidinii* se puso a prueba mediante el mismo procedimiento que en el ejemplo de referencia 5, y los valores se calcularon según (ecuación 6) y (ecuación 7) (tabla 1). Como resultado, se descubrió que la cepa BCRC 22528 de *Candida boidinii* es una levadura resistente a la vainillina así como resistente a la acetona.

45 [Tabla 1]

[Tabla 1] Resultados de la prueba de resistencia a la vainillina 1 (microorganismo de fermentación de etanol)

	Ejemplo de referencia 5	Ejemplo de referencia 6	Ejemplo de referencia 7	Ejemplo de referencia 8	Ejemplo de referencia 9	Ejemplo de referencia 10	Ejemplo de referencia 11	Ejemplo de referencia 12	Ejemplo de referencia 13	Ejemplo de referencia 14	Ejemplo de referencia 15
Nombre de la cepa	NBRC 10505	NBRC 10307	NBRC 10320	NBRC 2260	NBRC 272	NBRC 199	NBRC 10858	NBRC 1253	BCRC 21489	BCRC 21777	BCRC 22528
Resultado de la prueba de resistencia a la vainillina	6,8	1,9	11	83	100	82	84	95	54	22	66
Resultado de la prueba de resistencia a la acetona	8,8	1,3	100	86	87	100	22	111	74	1.8	49

(Ejemplo de referencia 16) Prueba de resistencia a la vainillina y prueba de resistencia a la acetona de la cepa NBRC 10505/ Δ PDC1::LDH de *Saccharomyces cerevisiae*

La cepa NBRC 10505/ Δ PDC1::LDH de *Saccharomyces cerevisiae* que es una levadura de fermentación del ácido láctico, se puso a prueba mediante el mismo procedimiento que en el ejemplo de referencia 5, y los valores se calcularon según (ecuación 6) y (ecuación 7) (tabla 2). Como resultado, se descubrió que la cepa NBRC 10505/ Δ PDC1::LDH de *Saccharomyces cerevisiae* es una levadura que no tiene resistencia a la vainillina ni a la acetona.

(Ejemplo de referencia 17) Prueba de resistencia a la vainillina y prueba de resistencia a la acetona de la cepa NBRC 2260/ Δ PDC1::LDH de *Saccharomyces cerevisiae*

La cepa NBRC 2260/ Δ PDC1::LDH de *Saccharomyces cerevisiae*, que es una levadura de fermentación del ácido láctico, se puso a prueba mediante el mismo procedimiento que en el ejemplo de referencia 5, y los valores se calcularon según (ecuación 6) y (ecuación 7) (tabla 2). Como resultado, se descubrió que la cepa NBRC 2260/ Δ PDC1::LDH de *Saccharomyces cerevisiae* es una levadura resistente a la vainillina así como resistente a la acetona.

(Ejemplo de referencia 18) Prueba de resistencia a la vainillina y prueba de resistencia a la acetona de la cepa NITE BP-1087 de *Saccharomyces cerevisiae*

La cepa NITE BP-1087 de *Saccharomyces cerevisiae*, que es una cepa de levadura resistente al pH bajo descrita en el documento WO 2012/147903, se puso a prueba mediante el mismo procedimiento que en el ejemplo de referencia 5 y los valores se calcularon según (ecuación 6) y (ecuación 7) (tabla 2). Como resultado, se descubrió que la cepa NITE BP-1087 es una levadura que no tiene resistencia a la vainillina ni a la acetona.

(Ejemplo de referencia 19) Prueba de resistencia a la vainillina y prueba de resistencia a la acetona de la cepa NITE BP-1088 de *Saccharomyces cerevisiae*

La cepa NITE BP-1088 de *Saccharomyces cerevisiae*, que es una cepa de levadura resistente al pH bajo descrita en el documento WO 2012/147903, se puso a prueba mediante el mismo procedimiento que en el ejemplo de referencia 5, y los valores se calcularon según (ecuación 6) y (ecuación 7) (tabla 2). Como resultado, se descubrió que la cepa NITE BP-1088 es una levadura que no tiene resistencia a la vainillina ni a la acetona.

(Ejemplo de referencia 20) Prueba de resistencia a la vainillina y prueba de resistencia a la acetona de la cepa NITE BP-1089 de *Saccharomyces cerevisiae*

La cepa NITE BP-1089 de los *Saccharomyces cerevisiae*, que es una cepa de levadura resistente al pH bajo descrita en el documento WO 2012/147903, se puso a prueba mediante el mismo procedimiento que en el ejemplo de referencia 5 y los valores se calcularon según (ecuación 6) y (ecuación 7) (tabla 2). Como resultado, se descubrió que la cepa NITE BP-1089 es una levadura que no tiene resistencia a la vainillina ni a la acetona.

[Tabla 2]

[Tabla 2] Resultados de la prueba de resistencia a la vainillina 2 (microorganismo de fermentación del ácido láctico)

	Ejemplo de referencia 16	Ejemplo de referencia 17	Ejemplo de referencia 18	Ejemplo de referencia 19	Ejemplo de referencia 20
Nombre de la cepa	Cepa NBRC 10505 Δ PDC1::LDH	Cepa NBRC 2260 Δ PDC1::LDH	BP-1087	BP-1088	BP-1089
Resultado de la prueba de resistencia a la vainillina	6,2	82	9,2	8,5	7,8
Resultado de la prueba de resistencia a la acetona	8	84	10	7,5	7,2

(Ejemplo de referencia 21) Producción de etanol por fermentación discontinua (pH 3) por la cepa NBRC 10505 de *Saccharomyces cerevisiae*

Como microorganismo de fermentación de etanol, se utilizó la cepa NBRC 10505 de *Saccharomyces cerevisiae*, que es una levadura que no tiene resistencia a la vainillina ni a la acetona, y, como medio, se utilizó medio YPAD para la fermentación continua, que contiene glucosa como componente principal de la materia prima de la fermentación. El medio YPAD para la fermentación continua tenía la siguiente composición: extracto de levadura al 1% (p/v), bactopectona al 2% (p/v), glucosa al 8% (p/v) y adenina al 0,04% (p/v). La cepa NBRC 10505 de *Saccharomyces cerevisiae* se inoculó en 5 ml del medio de precultivo mostrado en la tabla 3 en un tubo de ensayo y se cultivó con agitación durante una noche (precultivo previo). El líquido de cultivo obtenido se inoculó en 50 ml de un medio de precultivo fresco y se sometió a cultivo en un matraz Sakaguchi de 500 ml durante 8 horas a una temperatura de 30°C con agitación (precultivo). El líquido de precultivo se inoculó en 2 l del medio YPAD para la fermentación continua (cuyo pH se ajustó a 3,5 utilizando KOH 4 N antes de la inoculación), y la fermentación discontinua se llevó a cabo en las siguientes condiciones (tabla 4). El rendimiento se calculó según (ecuación 1). Como resultado, se pudo confirmar que, en la fermentación discontinua (pH 3) por la cepa NBRC 10505 de *Saccharomyces cerevisiae*, el etanol se puede producir sin dejar azúcar sin utilizar.

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

Capacidad del recipiente de reacción de fermentación: 1,5 (l)

Ajuste de temperatura: 30 (°C)

Velocidad de aireación en el recipiente de reacción de fermentación: 50 (ml/min.)

Velocidad de agitación en el recipiente de reacción de fermentación: 400 (rpm)

Ajuste de pH: ajustado a pH 3 con KOH 4 N

Esterilización: el recipiente de cultivo y todos los medios se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 20 minutos.

[Tabla 3]

[Tabla 3]
Medio de precultivo

Glucosa	100 g
Base de nitrógeno de levadura sin aminoácido (Difco)	6,7 g
Complemento de medio selectivo sintético de levaduras sin triptófano	1,72 g
Triptófano	76 mg
Adenina	76 mg
Unidad (1/litro)	

(Ejemplo de referencia 22) Producción de etanol por fermentación discontinua (pH 3) por la cepa NBRC 10307 de *Candida pignaliae*

Como microorganismo de fermentación de etanol, la cepa NBRC 10307 de *Candida pignaliae*, que es una levadura que no tiene resistencia a la vainillina ni a la acetona, se utilizó para realizar fermentación discontinua en las mismas condiciones que en el ejemplo de referencia 21, para producir etanol (tabla 4). Como resultado, se pudo confirmar que, en la fermentación discontinua (pH 3) por la cepa NBRC 10307 de *Candida pignaliae*, el etanol se puede producir sin dejar azúcar sin utilizar.

(Ejemplo de referencia 23) Producción de etanol por fermentación discontinua (pH 3) por la cepa NBRC 10320 de *Pichia mexicana*

Como microorganismo de fermentación de etanol, se utilizó la cepa NBRC 10320 de *Pichia mexicana*, que no es una levadura resistente a la vainillina, pero es una levadura resistente a la acetona, para realizar fermentación discontinua en las mismas condiciones que en el ejemplo de referencia 21, para producir etanol (tabla 4). Como resultado, se pudo confirmar que, en la fermentación discontinua (pH 3) por la cepa NBRC 10320 de *Pichia mexicana*, el etanol se puede producir sin dejar azúcar sin utilizar.

(Ejemplo de referencia 24) Producción de etanol por fermentación discontinua (pH 3) por la cepa NBRC 2260 de *Saccharomyces cerevisiae*

Como microorganismo de fermentación de etanol, se utilizó la cepa NBRC 2260 de *Saccharomyces cerevisiae*, que es una levadura resistente a la vainillina así como resistente a la acetona, para realizar fermentación discontinua en las mismas condiciones que en el ejemplo de referencia 21, para producir etanol (tabla 4). Como resultado, se pudo confirmar que, en la fermentación discontinua (pH 3) por la cepa NBRC 2260 de *Saccharomyces cerevisiae*, el etanol se puede producir sin dejar azúcar sin utilizar.

(Ejemplo de referencia 25) Producción de etanol por fermentación discontinua (pH 3) por la cepa NBRC 272 de *Kluyveromyces marxianus*

5 Como microorganismo de fermentación de etanol, se utilizó la cepa NBRC 272 de *Kluyveromyces marxianus*, que es una levadura resistente a la vainillina así como resistente a la acetona, para realizar fermentación discontinua en las mismas condiciones que en el ejemplo de referencia 21, para producir etanol (tabla 4). Como resultado, se pudo confirmar que, en la fermentación discontinua (pH 3) por la cepa NBRC 272 de *Kluyveromyces marxianus*, el etanol se puede producir sin dejar azúcar sin utilizar.

10 (Ejemplo de referencia 26) Producción de etanol por fermentación discontinua (pH 3) por la cepa NBRC 199 de *Candida tropicalis*

15 Como microorganismo de fermentación de etanol, se utilizó la cepa NBRC 199 de *Candida tropicalis*, que es una levadura resistente a la vainillina así como resistente a la acetona, para realizar fermentación discontinua en las mismas condiciones que en el ejemplo de referencia 21, para producir etanol (tabla 4). Como resultado, se pudo confirmar que, en la fermentación discontinua (pH 3) por la cepa NBRC 199 de *Candida tropicalis*, el etanol se puede producir sin dejar azúcar sin utilizar.

20 (Ejemplo de referencia 27) Producción de etanol por fermentación discontinua (pH 3) por la cepa NBRC 10858 de *Lindnera meyeræ*

25 Como microorganismo de fermentación de etanol, se utilizó la cepa NBRC 10858 de *Lindnera meyeræ*, que es una levadura resistente a la vainillina así como resistente a la acetona, para realizar fermentación discontinua en las mismas condiciones que en el ejemplo de referencia 21, para producir etanol (tabla 4). Como resultado, se pudo confirmar que, en la fermentación discontinua (pH 3) por la cepa NBRC 10858 de *Lindnera meyeræ* el etanol se puede producir sin dejar azúcar sin utilizar.

30 (Ejemplo de referencia 28) Producción de etanol por fermentación discontinua (pH 3) por la cepa NBRC 1253 de *Lindnera fabianii*

35 Como microorganismo de fermentación de etanol, se utilizó la cepa NBRC 1253 de *Lindnera fabianii*, que es una levadura resistente a la vainillina así como resistente a la acetona, para realizar fermentación discontinua en las mismas condiciones que en el ejemplo de referencia 21, para producir etanol (tabla 4). Como resultado, se pudo confirmar que, en la fermentación discontinua (pH 3) por la cepa NBRC 1253 de *Lindnera fabianii*, el etanol se puede producir sin dejar azúcar sin utilizar.

(Ejemplo de referencia 29) Producción de etanol por fermentación discontinua (pH 3) por la cepa BCRC 21489 de *Candida methanosorbosa*

40 Como microorganismo de fermentación de etanol, se utilizó la cepa BCRC 21489 de *Candida methanosorbosa*, que es una levadura resistente a la vainillina así como resistente a la acetona, para realizar fermentación discontinua en las mismas condiciones que en el ejemplo de referencia 21, para producir etanol (tabla 4). Como resultado, se pudo confirmar que, en la fermentación discontinua (pH 3) por la cepa BCRC 21489 de *Candida methanosorbosa*, el etanol se puede producir sin dejar azúcar sin utilizar.

45 (Ejemplo de referencia 30) Producción de etanol por fermentación discontinua (pH 3) por la cepa BCRC 21777 de *Pichia stipitis*

50 Como microorganismo de fermentación de etanol, se utilizó la cepa BCRC 21777 de *Pichia stipitis*, que es una levadura resistente a la vainillina, pero no una levadura resistente a la acetona, para realizar fermentación discontinua en las mismas condiciones que en el ejemplo de referencia 21, para producir etanol (tabla 4). Como resultado, se pudo confirmar que, en la fermentación discontinua (pH 3) por la cepa BCRC 21777 de *Pichia stipitis*, el etanol se puede producir sin dejar azúcar sin utilizar.

55 (Ejemplo de referencia 31) Producción de etanol por fermentación discontinua (pH 3) por la cepa BCRC 22528 de *Candida boidinii*

60 Como microorganismo de fermentación de etanol, se utilizó la cepa BCRC 22528 de *Candida boidinii*, que es una levadura resistente a la vainillina así como resistente a la acetona, para realizar fermentación discontinua en las mismas condiciones que en el ejemplo de referencia 21, para producir etanol (tabla 4). Como resultado, se pudo confirmar que, en la fermentación discontinua (pH 3) por la cepa BCRC 22528 de *Candida boidinii*, el etanol se puede producir sin dejar azúcar sin utilizar.

65

[Tabla 4]

[Tabla 4] Resultados de la fermentación de etanol 1 (fermentación discontinua, pH 3)

	Ejemplo de referencia 21	Ejemplo de referencia 22	Ejemplo de referencia 23	Ejemplo de referencia 24	Ejemplo de referencia 25	Ejemplo de referencia 26	Ejemplo de referencia 27	Ejemplo de referencia 28	Ejemplo de referencia 29	Ejemplo de referencia 30	Ejemplo de referencia 31
Período de cultivo (h)	25	28	20	15	18	16	20	19	16	22	20
Cantidad total de glucosa alimentada (g)	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80
Producción total de etanol (g)	33	32	33	34	33	33	33	33	33	32	33
Glucosa no utilizada (g)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Rendimiento (g/g)	0,41	0,4	0,41	0,42	0,41	0,41	0,41	0,41	0,41	0,4	0,41

(Ejemplo comparativo 1) Producción de etanol por fermentación continua (pH 3) por la cepa NBRC 10505 de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando membrana de separación

5 Como microorganismo de fermentación de etanol, se utilizó la cepa NBRC 10505 de *Saccharomyces cerevisiae*, que es una levadura que no tiene resistencia a la vainillina ni resistencia a la acetona y, como medio, el medio YPAD para la fermentación continua que contiene glucosa como componente principal de la materia prima de fermentación, que es el mismo medio que en el ejemplo de referencia. 21, para realizar un cultivo continuo utilizando una membrana de separación. Se empleó un elemento de membrana de separación que tenía una forma de fibra hueca. El medio YPAD para la fermentación continua tenía la siguiente composición: extracto de levadura al 1% (p/v), bactopectona al 2% (p/v), glucosa al 8% (p/v) y adenina al 0,04% (p/v). La cepa NBRC 10505 de *Saccharomyces cerevisiae* se inoculó en 5 ml del medio de precultivo que se muestra en la tabla 2 en un tubo de ensayo y se cultivó con agitación durante una noche (precultivo previo). El líquido de cultivo obtenido se inoculó en 50 ml de un medio de precultivo fresco y se sometió a cultivo en un matraz Sakaguchi de 500 ml durante 8 horas a una temperatura de 30°C con agitación (precultivo previo). El líquido de precultivo se inoculó en 1,5 l del medio YPAD para la fermentación continua (cuyo pH se ajustó a 3 utilizando KOH 4 N antes de la inoculación) en un aparato de fermentación continua, y el cultivo se realizó durante 19 horas mientras el recipiente de reacción de fermentación se agitó a 400 rpm utilizando el agitador unido, y se controlaron la velocidad de aireación, la temperatura y el pH en el recipiente de reacción de fermentación (precultivo). Después de completar el precultivo, se inició inmediatamente el funcionamiento de una bomba de circulación de líquido de fermentación y el suministro continuo del medio, y se realizó un cultivo continuo durante 250 horas en las siguientes condiciones, mientras que la cantidad del líquido de cultivo filtrado se controló de tal manera que el volumen de líquido de fermentación en el aparato de fermentación continua fue de 1,5 l, para producir etanol (tabla 5). El rendimiento se calculó según (ecuación 1).

25 Capacidad del recipiente de reacción de fermentación: 2 (l)
Membrana de separación utilizada: membrana de filtración de fluoruro de polivinilideno
Área de filtración efectiva del elemento de separación de membrana: 473 (cm²)
Ajuste de temperatura: 30 (°C)
30 Velocidad de aireación en el recipiente de reacción de fermentación: 50 (ml/min.)
Velocidad de agitación en el recipiente de reacción de fermentación: 400 (rpm)
Ajuste de pH: ajustado a pH 3 con KOH 4 N
Tasa de eliminación de líquido de fermentación: 5,5 (l/día)
Esterilización: el recipiente de cultivo que incluye el elemento de membrana de separación y todos los medios se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 20 minutos.

La membrana utilizada tiene las siguientes propiedades. La diferencia de presión transmembrana durante la filtración se cambió dentro del intervalo de 0,1 a 19,8 kPa.

40 Tamaño de poro promedio: 0,1 µm
Desviación estándar del tamaño de poro promedio: 0,035 µm
Rugosidad de la superficie de la membrana: 0,06 µm
Coeficiente de permeabilidad al agua pura: 50×10^{-9} m³/m²/s/pa

45 La figura 1 muestra la concentración de azúcar restante en el líquido de cultivo durante el precultivo, y la concentración de azúcar restante en el filtrado desde el principio hasta la finalización de la fermentación continua utilizando la membrana de separación. Como resultado, se descubrió que, en la fermentación continua (pH 3) por la cepa NBRC 10505 de *Saccharomyces cerevisiae* que utiliza la membrana de separación, una gran cantidad de azúcar que no se había consumido durante la fermentación continua se dejó sin utilizar en el filtrado, por lo que la eficiencia de producción fue baja.

(Ejemplo comparativo 2) Producción de etanol por fermentación continua (pH 3) por la cepa NBRC 10307 de *Candida pignaliae* utilizando membrana de separación

55 Como microorganismo de fermentación de etanol, se utilizó la cepa NBRC 10307 de *Candida pignaliae*, que es una levadura que no tiene resistencia a la vainillina ni a la acetona, para realizar fermentación continua utilizando una membrana de separación durante 230 horas en las mismas condiciones que en el ejemplo comparativo 1, para producir etanol (tabla 5). La figura 1 muestra la concentración de azúcar restante en el líquido de cultivo durante el precultivo, y la concentración de azúcar restante en el filtrado desde el principio hasta la finalización de la fermentación continua utilizando la membrana de separación. Como resultado, se descubrió que, en la fermentación continua (pH 3) por la cepa NBRC 10307 de *Candida pignaliae* utilizando la membrana de separación, una gran cantidad de azúcar que no se había consumido durante la fermentación continua se dejó sin utilizar en el filtrado, por lo que la eficiencia de producción fue baja.

(Ejemplo comparativo 3) Producción de etanol por fermentación continua (pH 3) por la cepa NBRC 10320 de *Pichia mexicana* utilizando membrana de separación

Como microorganismo de fermentación de etanol, se utilizó la cepa NBRC 10320 de *Pichia mexicana*, que no es una levadura resistente a la vainillina, pero es una levadura resistente a la acetona, para realizar fermentación continua utilizando una membrana de separación durante 215 horas en las mismas condiciones que en el ejemplo comparativo 1, para producir etanol (tabla 5). La figura 1 muestra la concentración de azúcar restante en el líquido de cultivo durante el precultivo, y la concentración de azúcar restante en el filtrado desde el principio hasta la finalización de la fermentación continua utilizando la membrana de separación. Como resultado, se descubrió que, en la fermentación continua (pH 3) por la cepa NBRC 10320 de *Pichia mexicana* utilizando la membrana de separación, una gran cantidad de azúcar que no se había consumido durante la fermentación continua se dejó sin utilizar en el filtrado, por lo que la eficiencia de producción fue baja. Se descubrió que, para reducir el azúcar restante y producir un producto químico de manera eficiente en las condiciones de fermentación continua (pH 3) utilizando la membrana de separación, es necesario la utilización de una cepa que tenga resistencia a la vainillina.

(Ejemplo 1) Producción de etanol por fermentación continua (pH 3) por la cepa NBRC 2260 de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando membrana de separación

Como microorganismo de fermentación de etanol, la cepa NBRC 2260 de *Saccharomyces cerevisiae*, que es una levadura resistente a la vainillina así como resistente a la acetona, se utilizó para realizar fermentación continua utilizando una membrana de separación durante 240 horas en las mismas condiciones que en el ejemplo comparativo 1, para producir etanol (tabla 5). La figura 1 muestra la concentración de azúcar restante en el líquido de cultivo durante el precultivo, y la concentración de azúcar restante en el filtrado desde el principio hasta la finalización de la fermentación continua utilizando la membrana de separación. Como resultado, se descubrió que la cepa NBRC 2260 de *Saccharomyces cerevisiae* puede reducir notablemente el azúcar restante inmediatamente después del inicio de la fermentación continua, para que el etanol se pueda producir de manera eficiente.

(Ejemplo 2) Producción de etanol por fermentación continua (pH 3) por la cepa NBRC 272 de *Kluyveromyces marxianus* utilizando membrana de separación

Como microorganismo de fermentación de etanol, se utilizó la cepa NBRC 272 de *Kluyveromyces marxianus*, que es una levadura resistente a la vainillina así como resistente a la acetona, para realizar fermentación continua utilizando una membrana de separación durante 220 horas en las mismas condiciones que en el ejemplo comparativo 1, para producir etanol (tabla 5). La figura 1 muestra la concentración de azúcar restante en el líquido de cultivo durante el precultivo, y la concentración de azúcar restante en el filtrado desde el principio hasta la finalización de la fermentación continua utilizando la membrana de separación. Como resultado, se descubrió que la cepa NBRC 272 de *Kluyveromyces marxianus* puede reducir notablemente el azúcar restante inmediatamente después del inicio de la fermentación continua, para que el etanol pueda producirse de manera eficiente.

(Ejemplo 3) Producción de etanol por fermentación continua (pH 3) por la cepa NBRC 199 de *Candida tropicalis* utilizando membrana de separación

Como microorganismo de fermentación de etanol, se utilizó la cepa NBRC 199 de *Candida tropicalis*, que es una levadura resistente a la vainillina así como resistente a la acetona, para realizar fermentación continua utilizando una membrana de separación durante 250 horas en las mismas condiciones que en el ejemplo comparativo 1, para producir etanol (tabla 5). La figura 1 muestra la concentración de azúcar restante en el líquido de cultivo durante el precultivo, y la concentración de azúcar restante en el filtrado desde el principio hasta la finalización de la fermentación continua utilizando la membrana de separación. Como resultado, se descubrió que la cepa NBRC 199 de *Candida tropicalis* puede reducir notablemente el azúcar restante inmediatamente después del inicio de la fermentación continua, para que el etanol se pueda producir de manera eficiente.

(Ejemplo 4) Producción de etanol por fermentación continua (pH 3) por la cepa NBRC 10858 de *Lindnera meyeræ* utilizando membrana de separación

Como microorganismo de fermentación de etanol, se utilizó la cepa NBRC 10858 de *Lindnera meyeræ*, que es una levadura resistente a la vainillina así como resistente a la acetona, para realizar fermentación continua utilizando una membrana de separación durante 230 horas en las mismas condiciones que en el ejemplo comparativo 1, para producir etanol (tabla 5). La figura 2 muestra la concentración de azúcar restante en el líquido de cultivo durante el precultivo, y la concentración de azúcar restante en el filtrado desde el principio hasta la finalización de la fermentación continua utilizando la membrana de separación. Como resultado, se descubrió que la cepa NBRC 10858 de *Lindnera meyeræ* puede reducir notablemente el azúcar restante inmediatamente después del inicio de la fermentación continua, para que el etanol se pueda producir de manera eficiente.

(Ejemplo 5) Producción de etanol por fermentación continua (pH 3) por la cepa NBRC 1253 de *Lindnera fabianii* utilizando membrana de separación

Como microorganismo de fermentación de etanol, se utilizó la cepa NBRC 1253 de *Lindnera fabianii*, que es una levadura resistente a la vainillina así como resistente a la acetona, para realizar fermentación continua utilizando una membrana de separación durante 230 horas en las mismas condiciones que en el ejemplo comparativo 1, para producir etanol (tabla 5). La figura 2 muestra la concentración de azúcar restante en el líquido de cultivo durante el precultivo y la concentración de azúcar restante en el filtrado desde el principio hasta la finalización de la fermentación continua utilizando la membrana de separación. Como resultado, se descubrió que la cepa NBRC 1253 de *Lindnera fabianii* puede reducir notablemente el azúcar restante inmediatamente después del inicio de la fermentación continua, para que el etanol se pueda producir de manera eficiente.

(Ejemplo 6) Producción de etanol por fermentación continua (pH 3) por la cepa BCRC 21489 de *Candida methanosorbosa* utilizando membrana de separación

Como microorganismo de fermentación de etanol, se utilizó la cepa BCRC 21489 de *Candida methanosorbosa*, que es una levadura resistente a la vainillina así como resistente a la acetona, para realizar fermentación continua utilizando una membrana de separación durante 230 horas en las mismas condiciones que en el ejemplo comparativo 1, para producir etanol (tabla 5). La figura 2 muestra la concentración de azúcar restante en el líquido de cultivo durante el precultivo y la concentración de azúcar restante en el filtrado desde el principio hasta la finalización de la fermentación continua utilizando la membrana de separación. Como resultado, se descubrió que la cepa BCRC 21489 de *Candida methanosorbosa*, que tiene resistencia a la vainillina y también a la acetona, puede reducir notablemente el azúcar restante inmediatamente después del inicio de la fermentación continua, para que el etanol pueda producirse de manera eficiente.

(Ejemplo 7) Producción de etanol por fermentación continua (pH 3) por la cepa BCRC 21777 de *Pichia stipitis* utilizando membrana de separación

Como microorganismo de fermentación de etanol, se utilizó la cepa BCRC 21777 de *Pichia stipitis* que es una levadura resistente a la vainillina, pero no una levadura resistente a la acetona, para realizar fermentación continua utilizando una membrana de separación durante 230 horas en las mismas condiciones que en el ejemplo comparativo 1, para producir etanol (tabla 5). La figura 2 muestra la concentración de azúcar restante en el líquido de cultivo durante el precultivo, y la concentración de azúcar restante en el filtrado desde el principio hasta la finalización de la fermentación continua utilizando la membrana de separación. Como resultado, la cepa BCRC 21777 de *Pichia stipitis* mostró el azúcar restante en el filtrado inmediatamente después del inicio de la fermentación continua, pero, a medida que avanzaba la fermentación continua, el resto del azúcar podía suprimirse notablemente, por lo que se descubrió que esta cepa era capaz de producir etanol de manera eficiente.

(Ejemplo 8) Producción de etanol por fermentación continua (pH 3) por la cepa BCRC 22528 de *Candida boidinii* utilizando membrana de separación

Como microorganismo de fermentación de etanol, se utilizó la cepa BCRC 22528 de *Candida boidinii*, que es una levadura resistente a la vainillina así como resistente a la acetona, para realizar fermentación continua utilizando una membrana de separación durante 230 horas en las mismas condiciones que en el ejemplo comparativo 1, para producir etanol (tabla 5). La figura 2 muestra la concentración de azúcar restante en el líquido de cultivo durante el precultivo, y la concentración de azúcar restante en el filtrado desde el principio hasta la finalización de la fermentación continua utilizando la membrana de separación. Como resultado, se descubrió que la cepa BCRC 22528 de *Candida boidinii* puede reducir notablemente el azúcar restante inmediatamente después del inicio de la fermentación continua, para que el etanol pueda producirse de manera eficiente.

[Tabla 5] Resultados de la fermentación de etanol 2 (fermentación continua utilizando una membrana, pH 3)

	Ejemplo comparativo 1	Ejemplo comparativo 2	Ejemplo comparativo 3	Ejemplo 1	Ejemplo 2	Ejemplo 3	Ejemplo 4	Ejemplo 5	Ejemplo 6	Ejemplo 7	Ejemplo 8
Período de cultivo (h)	250	230	215	240	220	250	230	230	230	230	230
Cantidad total de glucosa alimentada (g)	4.583	4.217	3.942	4.400	4.033	4.583	4.217	4.217	4.217	4.217	4.217
Producción total de etanol (g)	1.146	1.081	707	1.892	1.693	1.925	1.770	1.812	1.771	1.660	1.728
Glucosa no utilizada (g)	1.719	1.581	2.217	1	2	0.8	2	1	2	264	2
Rendimiento (g/g)	0,4	0,41	0,41	0,43	0,42	0,42	0,42	0,43	0,42	0,42	0,41

(Ejemplo de referencia 32) Producción de etanol por fermentación continua (pH 5) por la cepa NBRC 10505 de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando membrana de separación

Como microorganismo de fermentación de etanol, se utilizó la cepa NBRC 10505 de *Saccharomyces cerevisiae*, que es una levadura que no tiene resistencia a la vainillina ni a la acetona, para realizar fermentación continua utilizando una membrana de separación durante 200 horas en las mismas condiciones que en el ejemplo comparativo 1, excepto que el pH no se ajustó a 3 antes de la inoculación y que el pH se ajustó a 5, para producir etanol (tabla 6). Como resultado, se descubrió que, en la fermentación continua (pH 5) por la cepa NBRC 10505 de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando la membrana de separación, se puede producir etanol de manera eficiente.

(Ejemplo de referencia 33) Producción de etanol por fermentación continua (pH 5) por la cepa NBRC 2260 de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando membrana de separación

Como microorganismo de fermentación de etanol, se utilizó la cepa NBRC 2260 de *Saccharomyces cerevisiae*, que es una levadura resistente a la vainillina así como resistente a la acetona, para realizar fermentación continua utilizando una membrana de separación durante 210 horas en las mismas condiciones que en el ejemplo comparativo 1, excepto que el pH no se ajustó a 3 antes de la inoculación y que el pH se ajustó a 5, para producir etanol (tabla 6). Como resultado, se pudo confirmar que la cepa NBRC 2260 de *Saccharomyces cerevisiae* puede producir etanol de manera eficiente.

[Tabla 6]

[Tabla 6] Resultados de la fermentación de etanol 3 (fermentación continua utilizando una membrana, pH 5)

	Ejemplo de referencia 32	Ejemplo de referencia 33
Periodo de cultivo (h)	200	210
Cantidad total de glucosa alimentada (g)	3.667	3.850
Producción total de etanol (g)	1.540	1.655
Glucosa no utilizada (g)	1	1
Rendimiento (g/g)	0,42	0,43

(Ejemplo de referencia 34) Producción de ácido láctico por fermentación discontinua (pH 3) por la cepa NBRC 10505/ΔPDC1::LDH de *Saccharomyces cerevisiae*

Como microorganismo de fermentación del ácido láctico, se utilizó la cepa NBRC 10505/ΔPDC1::LDH de *Saccharomyces cerevisiae*, que es una levadura que no tiene resistencia a la vainillina ni a la acetona, para realizar fermentación discontinua en las mismas condiciones que en el ejemplo de referencia 21, para producir ácido láctico (tabla 7). Como resultado, se pudo confirmar que, en la fermentación discontinua (pH 3) por la cepa NBRC 10505/ΔPDC1::LDH de *Saccharomyces cerevisiae*, el ácido láctico se puede producir sin dejar azúcar sin utilizar.

(Ejemplo de referencia 35) Producción de ácido láctico por fermentación discontinua (pH 3) por la cepa NBRC 2260/ΔPDC1::LDH de *Saccharomyces cerevisiae*

Como microorganismo de fermentación del ácido láctico, se utilizó la cepa NBRC 2260/ΔPDC1::LDH de *Saccharomyces cerevisiae*, que es una levadura resistente a la vainillina así como resistente a la acetona, para realizar fermentación discontinua en las mismas condiciones que en el ejemplo de referencia 21, para producir ácido láctico (tabla 7). Como resultado, se pudo confirmar que, en la fermentación discontinua (pH 3) por la cepa NBRC 2260/ΔPDC1::LDH de *Saccharomyces cerevisiae*, el ácido láctico se puede producir sin dejar azúcar sin utilizar.

(Ejemplo de referencia 36) Producción de ácido láctico por fermentación discontinua (pH 3) por la cepa NITE BP-1087 de *Saccharomyces cerevisiae*

Como microorganismo de fermentación del ácido láctico, se utilizó la cepa NITE BP-1087 de *Saccharomyces cerevisiae*, que es una levadura que no tiene resistencia a la vainillina ni a la acetona, para realizar fermentación discontinua en las mismas condiciones que en el ejemplo de referencia 21, para producir ácido láctico (tabla 8). Como resultado, se pudo confirmar que, en la fermentación discontinua (pH 3) por la cepa NITE BP-1087 de *Saccharomyces cerevisiae*, el ácido láctico se puede producir sin dejar azúcar sin utilizar.

(Ejemplo de referencia 37) Producción de ácido láctico por fermentación discontinua (pH 3) por la cepa NITE BP-1088 de *Saccharomyces cerevisiae*

Como microorganismo de fermentación del ácido láctico, se utilizó la cepa NITE BP-1088 de *Saccharomyces*

cerevisiae, que es una levadura que no tiene resistencia a la vainillina ni a la acetona, para realizar fermentación discontinua en las mismas condiciones que en el ejemplo de referencia 21, para producir ácido láctico (tabla 8). Como resultado, se pudo confirmar que, en la fermentación discontinua (pH 3) por la cepa NITE BP-1088 de *Saccharomyces cerevisiae*, el ácido láctico se puede producir sin dejar azúcar sin utilizar.

5 (Ejemplo de referencia 38) Producción de ácido láctico por fermentación discontinua (pH 3) por la cepa NITE BP-1089 de *Saccharomyces cerevisiae*

10 Como microorganismo de fermentación del ácido láctico, se utilizó la cepa NITE BP-1089 de *Saccharomyces cerevisiae*, que es una levadura que no tiene resistencia a la vainillina ni a la acetona, para realizar fermentación discontinua en las mismas condiciones que en el ejemplo de referencia 21, para producir ácido láctico (tabla 8). Como resultado, se pudo confirmar que, en la fermentación discontinua (pH 3) por la cepa NITE BP-1089 de *Saccharomyces cerevisiae*, el ácido láctico se puede producir sin dejar azúcar sin utilizar.

15 (Ejemplo comparativo 4) Producción de ácido láctico por fermentación continua (pH 3) por la cepa NBRC 10505/ Δ PDC1::LDH de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando membrana de separación

20 Como microorganismo de fermentación del ácido láctico, se utilizó la cepa NBRC 10505/ Δ PDC1::LDH de *Saccharomyces cerevisiae*, que es una levadura que no tiene resistencia a la vainillina ni a la acetona, para realizar fermentación continua utilizando una membrana de separación durante 190 horas en las mismas condiciones que en el ejemplo comparativo 1, para producir ácido láctico (tabla 7). Como resultado, se descubrió que, en la fermentación continua (pH 3) por la cepa NBRC 10505/ Δ PDC1::LDH de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando la membrana de separación, hay azúcar no utilizada, por lo que la eficiencia de producción es baja.

25 (Ejemplo 9) Producción de ácido láctico por fermentación continua (pH 3) por la cepa NBRC 2260/ Δ PDC1::LDH de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando membrana de separación

30 Como microorganismo de fermentación del ácido láctico, se utilizó la cepa NBRC 2260/ Δ PDC1::LDH de *Saccharomyces cerevisiae*, que es una levadura resistente a la vainillina así como resistente a la acetona, para realizar fermentación continua utilizando una membrana de separación durante 200 horas en las mismas condiciones que en el ejemplo comparativo 1, excepto que se utilizó $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 5 N para el ajuste del pH para el precultivo, para producir ácido láctico (tabla 7). La figura 4 muestra la concentración de azúcar restante en el líquido de cultivo durante el precultivo, y la concentración de azúcar restante en el filtrado desde el principio hasta la finalización de la fermentación continua utilizando la membrana de separación. Como resultado, se descubrió la cepa NBRC 35 2260/ Δ PDC1::LDH de *Saccharomyces cerevisiae* puede reducir notablemente el azúcar restante inmediatamente después del inicio de la fermentación continua, para que el ácido láctico pueda producirse de manera eficiente.

40 (Ejemplo comparativo 5) Producción de ácido láctico por fermentación continua (pH 3) por la cepa NITE BP-1087 de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando membrana de separación

45 Como microorganismo de fermentación del ácido láctico, se utilizó la cepa NITE BP-1087 de *Saccharomyces cerevisiae*, que es una levadura que no tiene resistencia a la vainillina ni a la acetona, para realizar fermentación continua utilizando una membrana de separación durante 190 horas en las mismas condiciones que en el ejemplo comparativo 1, para producir ácido láctico (tabla 8). Como resultado, se descubrió que, en la fermentación continua (pH 3) por la cepa NITE BP-1087 de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando la membrana de separación, hay azúcar no utilizada, por lo que la eficiencia de producción es baja. Es decir, se descubrió que, incluso con una levadura resistente al pH bajo, el azúcar restante en la fermentación continua (pH 3) utilizando la membrana de separación no puede reducirse si la levadura no tiene resistencia a la vainillina, por lo que el ácido láctico no se puede producir de manera eficiente.

50 (Ejemplo comparativo 6) Producción de ácido láctico por fermentación continua (pH 3) por la cepa NITE BP-1088 de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando membrana de separación

55 Como microorganismo de fermentación del ácido láctico, se utilizó la cepa NITE BP-1088 de *Saccharomyces cerevisiae*, que es una levadura que no tiene resistencia a la vainillina ni a la acetona, para realizar fermentación continua utilizando una membrana de separación durante 200 horas en las mismas condiciones que en el ejemplo comparativo 1, para producir ácido láctico (tabla 8). Como resultado, se descubrió que, en la fermentación continua (pH 3) por la cepa NITE BP-1088 de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando la membrana de separación, hay azúcar no utilizada, por lo que la eficiencia de producción es baja. Es decir, se descubrió que, incluso con una levadura resistente al pH bajo, el resto del azúcar no se puede suprimir en la fermentación continua (pH 3) utilizando la membrana de separación si la levadura no tiene resistencia a la vainillina, por lo que el ácido láctico no se puede producir de manera eficiente.

60

(Ejemplo comparativo 7) Producción de ácido láctico por fermentación continua (pH 3) por la cepa NITE BP-1089 de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando membrana de separación

Como microorganismo de fermentación del ácido láctico, se utilizó la cepa NITE BP-1089 de *Saccharomyces cerevisiae*, que es una levadura que no tiene resistencia a la vainillina ni a la acetona, para realizar fermentación continua utilizando una membrana de separación durante 210 horas en las mismas condiciones que en el ejemplo comparativo 1, para producir ácido láctico (tabla 8). Como resultado, se descubrió que, en la fermentación continua (pH 3) por la cepa NITE BP-1089 de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando la membrana de separación, contiene azúcar no utilizada, por lo que la eficiencia de producción es baja. Es decir, se descubrió que, incluso con una levadura resistente al pH bajo, el azúcar restante en la fermentación continua (pH 3) utilizando la membrana de separación no se puede suprimir si la levadura no tiene resistencia a la vainillina, por lo que el ácido láctico no puede producirse de manera eficiente.

[Tabla 7]

[Tabla 7] Resultados de la fermentación del ácido láctico 2 (fermentación discontinua, fermentación continua utilizando una membrana, pH 3)

	Ejemplo de referencia 34	Ejemplo de referencia 35	Ejemplo comparativo 4	Ejemplo 9
Periodo de cultivo (h)	24	15	190	200
Cantidad total de glucosa alimentada (g)	80	80	3.483	3.667
Producción total de ácido láctico (g)	10	11	627	1.100
Glucosa no utilizada (g)	0	0	871	1
Rendimiento (g/g)	0,12	0,13	0,24	0,30

[Tabla 8]

[Tabla 8] Resultados de la fermentación del ácido láctico 1 (fermentación discontinua, fermentación continua utilizando una membrana, pH 3)

	Ejemplo de referencia 36	Ejemplo de referencia 37	Ejemplo de referencia 38	Ejemplo comparativo 5	Ejemplo comparativo 6	Ejemplo comparativo 7
Periodo de cultivo (h)	23	24	23	190	200	210
Cantidad total de glucosa alimentada (g)	80	80	80	3.483	3.667	3.850
Producción total de ácido láctico (g)	36	30	28	1.385	1.183	1.213
Glucosa no utilizada (g)	0	0	0	871	917	963
Rendimiento (g/g)	0,45	0,37	0,35	0,53	0,43	0,42

(Ejemplo de referencia 39) Producción de etanol por fermentación discontinua (pH 3,5) por la cepa NBRC 10505 de *Saccharomyces cerevisiae*

Como microorganismo de fermentación de etanol, se utilizó la cepa NBRC 10505 de *Saccharomyces cerevisiae*, que es una levadura que no tiene resistencia a la vainillina ni a la acetona, para realizar fermentación discontinua en las mismas condiciones que en el ejemplo de referencia 37, excepto que el pH se ajustó a 3,5 para producir etanol (tabla 9). Como resultado, se pudo confirmar que, en la fermentación discontinua (pH 3,5) por la cepa NBRC 10505 de *Saccharomyces cerevisiae*, el ácido láctico se puede producir sin dejar azúcar sin utilizar.

(Ejemplo de referencia 40) Producción de etanol por fermentación discontinua (pH 3,5) por la cepa NBRC 2260 de *Saccharomyces cerevisiae*

Como microorganismo de fermentación de etanol, se utilizó la cepa NBRC 2260 de *Saccharomyces cerevisiae*, que es una levadura resistente a la vainillina así como resistente a la acetona, para realizar fermentación discontinua en las mismas condiciones que en el ejemplo de referencia 37, excepto que el pH se ajustó a 3,5 para producir etanol

(tabla 9). Como resultado, se pudo confirmar que, en la fermentación discontinua (pH 3,5) por la cepa NBRC 2260 de *Saccharomyces cerevisiae*, se puede producir ácido láctico sin dejar azúcar sin utilizar.

(Ejemplo comparativo 8) Producción de etanol por fermentación continua (pH 3,5) por la cepa NBRC 10505 de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando membrana de separación

Como microorganismo de fermentación de etanol, se utilizó la cepa NBRC 10505 de *Saccharomyces cerevisiae*, que es una levadura que no tiene resistencia a la vainillina ni a la acetona, para realizar fermentación continua utilizando una membrana de separación durante 225 horas en las mismas condiciones que en el ejemplo comparativo 1, excepto que el pH se ajustó a 3,5 para producir etanol (tabla 9). Como resultado, se descubrió que, en la fermentación continua (pH 3,5) por la cepa NBRC 10505 de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando la membrana de separación, hay azúcar no utilizada, por lo que la eficiencia de producción es baja.

(Ejemplo 10) Producción de etanol por fermentación continua (pH 3,5) por la cepa NBRC 2260 de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando membrana de separación

Como microorganismo de fermentación de etanol, se utilizó la cepa NBRC 2260 de *Saccharomyces cerevisiae*, que es una levadura resistente a la vainillina así como resistente a la acetona, para realizar fermentación continua utilizando una membrana de separación durante 260 horas en las mismas condiciones que en el ejemplo comparativo 1, excepto que el pH se ajustó a 3,5, para producir etanol (tabla 9). Como resultado, se descubrió que el azúcar restante se puede reducir notablemente, de modo que el etanol se puede producir de manera eficiente.

[Tabla 9]

[Tabla 9] Resultados de la fermentación de etanol 4 (fermentación discontinua, fermentación continua utilizando una membrana, pH 3,5)

	Ejemplo de referencia 39	Ejemplo de referencia 40	Ejemplo comparativo 8	Ejemplo 10
Periodo de cultivo (h)	21	15	225	260
Cantidad total de glucosa alimentada (g)	80	80	4.125	4.767
Producción total de etanol (g)	33	33	1.429	2.049
Glucosa no utilizada (g)	0	0	722	1
Rendimiento (g/g)	0,41	0,41	0,41	0,43

(Ejemplo comparativo 9) Producción de etanol por fermentación continua (pH 3; velocidad de alimentación de azúcar, 2 g/(l·h)) por la cepa NBRC 10505 de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando membrana de separación

Como microorganismo de fermentación de etanol, se utilizó la cepa NBRC 10505 de *Saccharomyces cerevisiae*, que es una levadura que no tiene resistencia a la vainillina ni a la acetona, para realizar fermentación continua utilizando una membrana de separación durante 190 horas en las mismas condiciones que en el ejemplo comparativo 1, excepto que la tasa de eliminación fue de 0,9 l/día, y que la velocidad de alimentación del azúcar fue de 2 g/(l·h), para producir etanol (tabla 10). Como resultado, se descubrió que, en la fermentación continua por la cepa NBRC 10505 de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando la membrana de separación (velocidad de alimentación de azúcar, 2 g/(l·h)), hay azúcar no utilizada, por lo que la eficiencia de producción es baja.

(Ejemplo comparativo 10) Producción de etanol por fermentación continua (pH 3; velocidad de alimentación de azúcar, 4 g/(l·h)) por la cepa NBRC 10505 de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando membrana de separación

Como microorganismo de fermentación de etanol, se utilizó la cepa NBRC 10505 de *Saccharomyces cerevisiae*, que es una levadura que no tiene resistencia a la vainillina ni a la acetona, para realizar fermentación continua utilizando una membrana de separación durante 200 horas en las mismas condiciones que en el ejemplo comparativo 1, excepto que la tasa de eliminación fue de 1,8 l/día, y que la velocidad de alimentación del azúcar fue de 4 g/(l·h), para producir etanol (tabla 10). Como resultado, se descubrió que, en la fermentación continua por la cepa NBRC 10505 de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando la membrana de separación (velocidad de alimentación de azúcar, 4 g/(l·h)), hay azúcar no utilizada, por lo que la eficiencia de producción es baja.

(Ejemplo comparativo 11) Producción de etanol por fermentación continua (pH 3; velocidad de alimentación de azúcar, 5 g/(l·h)) por la cepa NBRC 10505 de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando membrana de separación

Como microorganismo de fermentación de etanol, se utilizó la cepa NBRC 10505 de *Saccharomyces cerevisiae*, que es una levadura que no tiene resistencia a la vainillina ni a la acetona, para realizar fermentación continua utilizando una membrana de separación durante 210 horas en las mismas condiciones que en el ejemplo comparativo 1, excepto que la tasa de eliminación fue de 2,25 l/día, y que la velocidad de alimentación del azúcar fue de 5 g/(l·h), para producir etanol (tabla 10). Como resultado, se descubrió que, en la fermentación continua por la cepa NBRC 10505 de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando la membrana de separación (velocidad de alimentación de azúcar, 5 g/(l·h)), hay azúcar no utilizada, por lo que la eficiencia de producción es baja.

(Ejemplo comparativo 12) Producción de etanol por fermentación continua (pH 3; velocidad de alimentación de azúcar, 8 g/(l·h)) por la cepa NBRC 10505 de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando membrana de separación

Como microorganismo de fermentación de etanol, se utilizó la cepa NBRC 10505 de *Saccharomyces cerevisiae*, que es una levadura que no tiene resistencia a la vainillina ni a la acetona, para realizar fermentación continua utilizando una membrana de separación durante 190 horas en las mismas condiciones que en el ejemplo comparativo 1, excepto que la tasa de eliminación fue de 3,6 l/día, y que la velocidad de alimentación de azúcar fue de 8 g/(l·h), para producir etanol (tabla 10). Como resultado, se descubrió que, en la fermentación continua por la cepa NBRC 10505 de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando la membrana de separación (velocidad de alimentación de azúcar, 8 g/(l·h)), hay azúcar no utilizada, por lo que la eficiencia de producción es baja.

(Ejemplo comparativo 13) Producción de etanol por fermentación continua (pH 3; velocidad de alimentación de azúcar, 10 g/(l·h)) por la cepa NBRC 10505 de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando membrana de separación

Como microorganismo de fermentación de etanol, se utilizó la cepa NBRC 10505 de *Saccharomyces cerevisiae*, que es una levadura que no tiene resistencia a la vainillina ni a la acetona, para realizar fermentación continua utilizando una membrana de separación durante 200 horas en las mismas condiciones que en el ejemplo comparativo 1, excepto que la tasa de eliminación fue de 4,5 l/día, y que la velocidad de alimentación del azúcar fue de 10 g/(l·h), para producir etanol (tabla 10). Como resultado, se descubrió que, en la fermentación continua por la cepa NBRC 10505 de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando la membrana de separación (velocidad de alimentación de azúcar, 10 g/(l·h)), hay azúcar no utilizada, por lo que la eficiencia de producción es baja.

[Tabla 10]

[Tabla 10] Resultados de la fermentación de etanol 5 (fermentación continua utilizando una membrana, pH 3)

	Ejemplo comparativo 9	Ejemplo comparativo 10	Ejemplo comparativo 11	Ejemplo comparativo 12	Ejemplo comparativo 13
Periodo de cultivo (h)	190	200	210	190	200
Cantidad total de glucosa alimentada (g)	570	1.200	1.575	2.280	3.000
Producción total de etanol (g)	219	394	449	627	780
Glucosa no utilizada (g)	36	240	453	713	1.050
Rendimiento (g/g)	0,41	0,41	0,4	0,40	0,4
Velocidad de alimentación de azúcar (g/(l·h))	2	4	5	8	10
Glucosa no utilizada/cantidad total de líquido filtrado (g/l)	5	16	23	25	28

(Ejemplo 11) Producción de etanol por fermentación continua (pH 3; velocidad de alimentación de azúcar, 2 g/(l·h)) por la cepa NBRC 2260 de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando membrana de separación

Como microorganismo de fermentación de etanol, se utilizó la cepa NBRC 10505 de *Saccharomyces cerevisiae*, que es una levadura resistente a la vainillina así como resistente a la acetona, para realizar fermentación continua utilizando una membrana de separación durante 195 horas en las mismas condiciones que en el ejemplo comparativo 1, excepto que la tasa de eliminación fue de 0,9 l/día y que la velocidad de alimentación de azúcar fue de 2 g/(l·h), para producir etanol (tabla 11). Como resultado, se descubrió la cepa NBRC 2260 de *Saccharomyces cerevisiae* puede reducir

notablemente el azúcar restante, de modo que el etanol se puede producir de manera eficiente.

(Ejemplo 12) Producción de etanol por fermentación continua (pH 3; velocidad de alimentación de azúcar, 4 g/(l·h)) por la cepa NBRC 2260 de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando membrana de separación

Como microorganismo de fermentación de etanol, se utilizó la cepa NBRC 2260 de *Saccharomyces cerevisiae*, que es una levadura resistente a la vainillina así como resistente a la acetona, para realizar fermentación continua utilizando una membrana de separación durante 195 horas en las mismas condiciones que en el ejemplo comparativo 1, excepto que la tasa de eliminación fue de 1,8 l/día, y que la velocidad de alimentación de azúcar fue de 4 g/(l·h), para producir etanol (tabla 11). Como resultado, se descubrió que el azúcar restante se puede reducir notablemente, de modo que el etanol se puede producir de manera eficiente.

(Ejemplo 13) Producción de etanol por fermentación continua (pH 3; velocidad de alimentación de azúcar, 5 g/(l·h)) por la cepa NBRC 2260 de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando membrana de separación

Como microorganismo de fermentación de etanol, se utilizó la cepa NBRC 2260 de *Saccharomyces cerevisiae*, que es una levadura resistente a la vainillina así como resistente a la acetona, para realizar una fermentación continua utilizando una membrana de separación durante 210 horas en las mismas condiciones que en el ejemplo comparativo 1, excepto que la tasa de eliminación fue de 2,25 l/día, y que la velocidad de alimentación del azúcar fue de 5 g/(l·h), para producir etanol (tabla 11). Como resultado, se descubrió que el azúcar restante se puede reducir notablemente, de modo que el etanol se puede producir de manera eficiente.

(Ejemplo 14) Producción de etanol por fermentación continua (pH 3; velocidad de alimentación de azúcar, 8 g/(l·h)) por la cepa NBRC 2260 de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando membrana de separación

Como microorganismo de fermentación de etanol, se utilizó la cepa NBRC 2260 de *Saccharomyces cerevisiae*, que es una levadura resistente a la vainillina así como resistente a la acetona, para realizar una fermentación continua utilizando una membrana de separación durante 195 horas en las mismas condiciones que en el ejemplo comparativo 1, excepto que la tasa de eliminación fue de 3,6 l/día y que la velocidad de alimentación del azúcar fue de 8 g/(l·h), para producir etanol (tabla 11). Como resultado, se descubrió que el azúcar restante se puede reducir notablemente, de modo que el etanol se puede producir de manera eficiente.

(Ejemplo 15) Producción de etanol por fermentación continua (pH 3; velocidad de alimentación de azúcar, 10 g/(l·h)) por la cepa NBRC 2260 de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando membrana de separación

Como microorganismo de fermentación de etanol, se utilizó la cepa NBRC 2260 de *Saccharomyces cerevisiae*, que es una levadura resistente a la vainillina así como resistente a la acetona, para realizar una fermentación continua utilizando una membrana de separación durante 205 horas en las mismas condiciones que en el ejemplo comparativo 1, excepto que la tasa de eliminación fue de 4,5 l/día y que la velocidad de alimentación de azúcar fue de 10 g/(l·h), para producir etanol (tabla 11). Como resultado, se descubrió que el azúcar restante se puede reducir notablemente, de modo que el etanol se puede producir de manera eficiente.

[Tabla 11]

[Tabla 11] Resultados de la fermentación de etanol 6 (fermentación continua utilizando una membrana, pH 3)

	Ejemplo 11	Ejemplo 12	Ejemplo 13	Ejemplo 14	Ejemplo 15
Periodo de cultivo (h)	195	195	210	195	205
Cantidad total de glucosa alimentada (g)	585	1.170	1.575	2.340	3.075
Producción total de etanol (g)	245	491	677	1.006	1.321
Glucosa no utilizada (g)	1	1	1	1	2
Rendimiento (g/g)	0,42	0,42	0,43	0,43	0,43
Velocidad de alimentación de azúcar (g/(l·h))	2	4	5	8	10
Glucosa no utilizada/cantidad total de líquido filtrado (g/l)	0	0	0	0	0

APLICABILIDAD INDUSTRIAL

Por la presente invención, las eficiencias de la producción por fermentación de diversos productos químicos pueden mejorarse en la fermentación continua utilizando una membrana de separación en condiciones de pH bajo, sin dejar una gran cantidad de azúcar no utilizada.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para producir un producto químico, comprendiendo dicho procedimiento filtrar un líquido de cultivo de levadura resistente a la vainillina a través de una membrana de separación mientras se retiene o se refluye el líquido no filtrado en dicho líquido de cultivo, y añadiendo una materia prima de fermentación a dicho líquido de cultivo, para realizar fermentación continua en condiciones de pH de no más de 3,5, en el que, como dicha levadura, se utiliza levadura cuyo líquido de cultivo obtenido en las siguientes condiciones (a) muestra una absorbancia a 600 nm de no menos del 20% de la absorbancia a 600 nm de un líquido de cultivo obtenido en las siguientes condiciones (b):
Condiciones (a): 40 horas de cultivo en medio YPAD complementado con vainillina (concentración final, 1 g/l) (absorbancia a 600 nm al comienzo del cultivo, 0,2);
Condiciones (b): cultivo en las mismas condiciones que en las condiciones (a), excepto que el medio YPAD no contiene vainillina.
2. Procedimiento para producir un producto químico, según la reivindicación 1, en el que, como dicha levadura, se utiliza levadura cuyo líquido de cultivo obtenido en las condiciones (a) muestra una absorbancia a 600 nm de no menos del 50% de la absorbancia a 600 nm de un líquido de cultivo obtenido en las condiciones (b).
3. Procedimiento para producir un producto químico, según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que, como dicha levadura, se utiliza levadura cuyo líquido de cultivo obtenido en las siguientes condiciones (c) muestra una absorbancia a 600 nm de no menos del 20% de la absorbancia a 600 nm de un líquido de cultivo obtenido en las siguientes condiciones (d):
Condiciones (c): 40 horas de cultivo en medio YPAD complementado con acetona al 4% (v/v) (absorbancia a 600 nm al comienzo del cultivo, 0,2);
Condiciones (d): cultivo en las mismas condiciones que en las condiciones (c), excepto que el medio YPAD no contiene acetona.
4. Procedimiento para producir un producto químico, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la velocidad de alimentación de dicha materia prima de fermentación no es inferior a 4 g/(l·h).
5. Procedimiento para producir un producto químico, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho producto químico es un ácido orgánico o un alcohol.

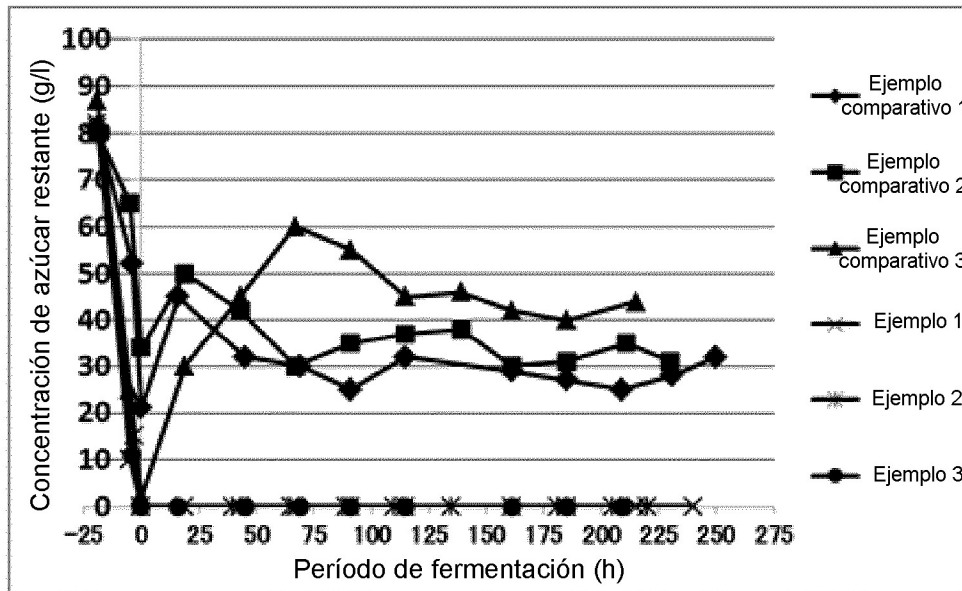


Fig.1

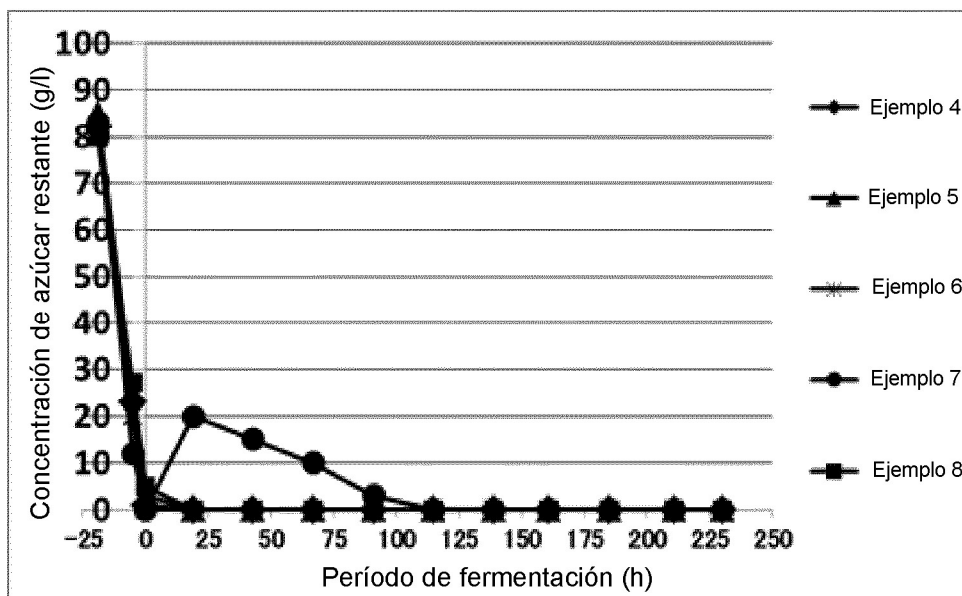


Fig.2