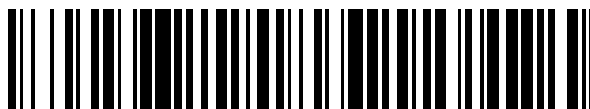


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 728 376**

51 Int. Cl.:

C12P 13/04	(2006.01) C12P 13/00	(2006.01)
C12M 1/34	(2006.01)	
C12M 1/00	(2006.01)	
C12P 7/06	(2006.01)	
C12P 7/18	(2006.01)	
C12P 7/46	(2006.01)	
C12P 7/50	(2006.01)	
C12P 7/56	(2006.01)	
C12P 13/08	(2006.01)	
C12P 19/30	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.02.2007 PCT/JP2007/052853**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **30.08.2007 WO07097260**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.02.2007 E 07714383 (2)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2019 EP 1988170**

54 Título: **Procedimiento de producción de un producto químico y aparato de fermentación continua**

30 Prioridad:

24.02.2006 JP 2006048181
26.07.2006 JP 2006203072

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.10.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

SAWAI, HIDEKI;
YAMADA, KATSUSHIGE;
MIMITSUKA, TAKASHI;
SAWAI, KENJI;
YONEHARA, TETSU;
ITO, YOHITO y
HENMI, MASAHIRO

74 Agente/Representante:

DURAN-CORRETJER, S.L.P

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 728 376 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de producción de un producto químico y aparato de fermentación continua

5 Sector técnico

La presente invención se refiere a un procedimiento de producción de un producto químico y un aparato de fermentación continua.

10 Antecedentes técnicos

El procedimiento de fermentación que es un procedimiento de producción de una sustancia, que implica cultivar un microorganismo o las células cultivadas, puede clasificarse aproximadamente en (1) un procedimiento de fermentación discontinua o un procedimiento de fermentación discontinua alimentada y (2) un procedimiento de fermentación continua.

15 El procedimiento de fermentación discontinua o discontinua alimentada tiene ventajas tales como instalaciones simples y menos daño por las bacterias contaminantes porque es un cultivo a corto plazo. Sin embargo, la concentración de un producto en un cultivo aumenta con el tiempo para reducir la productividad y el rendimiento debido a la influencia de la presión osmótica o la inhibición por parte del producto. Por consiguiente, es difícil mantener de forma estable un alto rendimiento y una alta productividad durante un tiempo prolongado.

20 El procedimiento de fermentación continua se caracteriza por que se pueden mantener un alto rendimiento y una alta productividad durante mucho tiempo al prevenir la acumulación de una sustancia objetivo a una alta concentración en un fermentador. Se han dado a conocer procedimientos de fermentación continua para la fermentación de ácido L-glutámico y L-lisina (documento no de patente 1). Sin embargo, en estos ejemplos, las materias primas son alimentadas de forma continua a un cultivo mientras se retira un cultivo que contiene microorganismos y células, de modo que los microorganismos y las células en el cultivo se diluyen y, por lo tanto, la mejora en la eficiencia de producción es limitada.

25 En el procedimiento de fermentación continua, se ha propuesto que los microorganismos y las células cultivadas se filtran con una membrana de separación para recuperar el producto a partir de un filtrado, mientras que los microorganismos y las células cultivadas filtrados se retienen en, un cultivo o se devuelven por reflujo al mismo, manteniendo de este modo una alta densidad de los microorganismos y células cultivadas en el cultivo.

30 Por ejemplo, se han dado a conocer técnicas de fermentación continua en un aparato de fermentación continua que utiliza una membrana de cerámica (documentos de patente 1, 2 y 3). Sin embargo, las técnicas dadas a conocer tienen un problema en la reducción del caudal de filtración y la eficiencia de filtración causada por la obstrucción de la membrana de cerámica, y para la prevención de esta obstrucción, se lleva a cabo el lavado inverso o similar.

35 Se ha dado a conocer un proceso para producir ácido succínico utilizando una membrana de separación (documento de patente 4). En esta técnica, se utiliza una alta presión de filtración (aproximadamente 200 kPa) en la separación con membrana. Esta alta presión de filtración no solo tiene desventajas en los costes sino que también causa daños físicos a los microorganismos y las células por la presión en el tratamiento de filtración y, por lo tanto, no es adecuada para la fermentación continua en la que los microorganismos y las células se devuelven continuamente a un cultivo.

40 El cultivo continuo convencional es un procedimiento de cultivo en el que se alimenta un medio fresco a un ritmo constante a un fermentador, y un cultivo en la misma cantidad que se descarga el medio del fermentador, manteniendo de este modo constante el volumen de fluido en el fermentador. En el cultivo discontinuo, el cultivo se termina cuando se consume un sustrato inicial, mientras que en el cultivo continuo, el cultivo puede continuarse teóricamente hasta el infinito. Es decir, la fermentación infinita es teóricamente factible.

45 En el cultivo continuo convencional, por otra parte, se descargan los microorganismos junto con un cultivo de un fermentador, por lo que la densidad de los microorganismos en el fermentador apenas se mantiene alta. Si los microorganismos en fermentación pueden mantenerse a una alta densidad en la producción por fermentación, se puede mejorar la eficiencia de la producción por fermentación por volumen de fermentación. Para este fin, los microorganismos deben ser retenidos en un fermentador o devueltos por reflujo al mismo. El procedimiento en el que los microorganismos son retenidos en un fermentador o son devueltos por reflujo al mismo, incluye un procedimiento que implica la separación sólido-líquido de un cultivo descargado por gravedad, por ejemplo, la centrifugación y la devolución de microorganismos precipitados a un fermentador, y un procedimiento que implica la filtración para separar microorganismos como sólidos y descargar un sobrenadante de cultivo solo de un fermentador. Sin embargo, el procedimiento que utiliza centrifugación no es práctico debido al alto coste energético. El procedimiento que utiliza filtración requiere alta presión para la filtración, tal como se ha descrito anteriormente y se ha examinado principalmente a nivel de laboratorio.

Tal como se ha descrito anteriormente, los procedimientos convencionales de fermentación continua adolecen de diversos problemas y apenas son aplicables industrialmente.

Es decir, aún es difícil en el procedimiento de fermentación continua lograr una alta productividad de la sustancia filtrando microorganismos y células con una membrana de separación, recuperando de este modo un producto a partir de un filtrado y, simultáneamente, devolviendo por reflujo los microorganismos y las células filtradas a un cultivo para mejorar la densidad de los microorganismos y las células en el cultivo y para mantener su densidad alta. Por lo tanto, ha habido demandas de innovaciones en las técnicas.

El documento de patente 5 da a conocer un procedimiento basado en membrana para la recuperación de ácido láctico mediante la fermentación de sustratos de hidratos de carbono que contienen azúcares que implica la fermentación y utilización de ultrafiltración para separar las células MO del medio que contiene el producto. Se describe que los poros de la membrana no son superiores a 0,375 μm y se puede utilizar una presión de 445 a 790 kPa.

El documento no de patente 2 se refiere a una filtración de membrana de flujo transversal de suspensiones de levaduras y muestra una correlación entre una presión de transmembrana inferior y un flujo superior cuando se aumenta la concentración de células.

Documento de patente 1: Solicitud de patente japonesa abierta a inspección pública (JP-A) No. 5-95778

Documento de patente 2: JP-A No. 62-138184

Documento de patente 3: JP-A No. 10-174594

Documento de patente 4: JP-A No. 2005-333886

Documento no de patente 1: Toshihiko Hirao y otros, Appl. Microbiol. Biotechnol., 32, 269-273 (1989)

Documento no de patente 2: P.N. Patel y otros, Journal of Biotechnology, 5 (1987), 1-16

Características de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento de producción de un producto químico a través de fermentación continua que incluye filtrar un cultivo de un microorganismo o las células cultivadas con una membrana de separación para recuperar un producto a partir de un filtrado y retener simultáneamente un fluido no filtrado en el cultivo, o devolverlo por reflujo al mismo, y añadir materiales de fermentación al cultivo, en el que una membrana porosa que tiene un tamaño de poro promedio de 0,01 μm o más a menos de 1 μm se utiliza como la membrana de separación y la filtración se lleva a cabo con una diferencia de presión transmembrana en el intervalo de 0,1 a 20 kPa.

La presente invención se refiere al procedimiento de producción de un producto químico, en el que el coeficiente de permeabilidad al agua purificada de la membrana porosa es, preferentemente, de $2 \times 10^{-9} \text{ m}^3/\text{m}^2/\text{s}/\text{pa}$ o más a $6 \times 10^{-7} \text{ m}^3/\text{m}^2/\text{s}/\text{pa}$ o menos.

La presente invención se refiere al procedimiento de producción de un producto químico, en el que el tamaño de poro promedio de la membrana porosa es, preferentemente, de 0,01 μm o más a menos de 0,2 μm , y la desviación estándar del tamaño de poro de la membrana porosa es, preferentemente, de 0,1 μm o menos.

La presente invención se refiere al procedimiento de producción de un producto químico, en el que la membrana porosa es, preferentemente, una membrana porosa que tiene una rugosidad superficial de 0,1 μm o menos.

La presente invención se refiere al procedimiento de producción de un producto químico, en el que la membrana porosa es, preferentemente, una membrana porosa que contiene una capa de resina porosa.

Un aparato de fermentación continua de la presente invención es un aparato para producir un producto químico a través de fermentación continua que incluye filtrar un cultivo de fermentación de un microorganismo o las células cultivadas con una membrana de separación para recuperar un producto a partir de un filtrado y retener simultáneamente un fluido no filtrado en el cultivo de fermentación, o devolverlo por reflujo al mismo, y añadir materiales de fermentación al cultivo de fermentación, que incluye un tanque de reacción de fermentación para cultivo de fermentación de un microorganismo o las células cultivadas; un tanque de separación por membrana para filtración del cultivo de fermentación, que está conectado mediante medios de circulación del cultivo de fermentación al tanque de reacción de fermentación y dotado en su interior de una membrana de separación; y medios para regular la diferencia de presión transmembrana de la membrana de separación en el intervalo de 0,1 a 20 kPa, en el que la membrana de separación es una membrana porosa que tiene un tamaño de poro promedio de 0,01 μm o más a menos de 1 μm .

Otro aparato de fermentación continua de la presente invención es un aparato para producir un producto químico a través de fermentación continua que incluye filtrar un cultivo de fermentación de un microorganismo o las células cultivadas con una membrana de separación para recuperar un producto a partir de un filtrado y retener

simultáneamente un fluido no filtrado en el cultivo de fermentación, o devolverlo por reflujo al mismo, y añadir materiales de fermentación al cultivo de fermentación, que incluye un tanque de reacción de fermentación para cultivo de fermentación de un microorganismo o las células cultivadas; un elemento de membrana de separación para filtración del cultivo de fermentación, que está dispuesto en el interior del tanque de reacción de fermentación y
5
dotado en su interior de una membrana de separación; medios para descargar un producto de fermentación filtrado, que están conectados al elemento de membrana de separación; y medios para regular la diferencia de presión transmembrana de la membrana de separación en el intervalo de 0,1 a 20 kPa, en el que la membrana de separación es una membrana porosa que tiene un tamaño de poro promedio de 0,01 μm o más a menos de 1 μm .

10 Descripción breve de los dibujos

La figura 1 es una vista lateral esquemática para mostrar un ejemplo del aparato de fermentación continua de tipo de separación por membrana utilizado en la presente invención.

La figura 2 es una vista lateral esquemática para mostrar otro ejemplo del aparato de fermentación continua de tipo
15
de separación por membrana utilizado en la presente invención.

La figura 3 es una vista en perspectiva esquemática para mostrar un ejemplo del elemento de membrana de separación utilizado en la presente invención.

La figura 4 es una vista de sección transversal para mostrar otro ejemplo del elemento de membrana de separación utilizado en la presente invención.

La figura 5 muestra un mapa físico del vector de expresión de levadura pTRS11.

20 Descripción de los números de referencia

- 1 Tanque de reacción de fermentación
- 25 2 Elemento de membrana de separación
- 3 Aparato de regulación de la diferencia de carga hidrostática
- 4 Aparato de alimentación de gas
- 5 Agitador
- 6 Sensor de nivel
- 30 7 Bomba de alimentación de medio
- 8 bomba de alimentación de solución reguladora del pH
- 9 sensor/regulador de pH
- 10 Regulador de temperatura
- 11 Bomba de circulación de licor de fermentación
- 35 12 Tanque de separación por membrana
- 13 Placa de soporte
- 14 Material de pasaje
- 15 Membrana de separación
- 16 Parte cóncava
- 40 17 Tubería de recogida de agua
- 18 Haz de membrana de separación
- 19 Capa de sellado de resina superior
- 20 Capa de sellado de resina inferior
- 21 Marco de soporte
- 45 22 Tubería de recogida de agua.

Mejor modo para llevar a cabo la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento de producción de un producto químico a través de fermentación
50
continua que incluye filtrar un cultivo de un microorganismo o las células cultivadas con una membrana de separación para recuperar un producto a partir de un filtrado y retener, simultáneamente, un fluido no filtrado en el cultivo, o devolverlo por reflujo al mismo, y añadir materiales de fermentación al cultivo, en el que una membrana porosa que tiene un tamaño de poro promedio de 0,01 μm o más a menos de 1 μm se utiliza como la membrana de separación y la filtración se lleva a cabo con una diferencia de presión transmembrana en el intervalo de 0,1 a
55
20 kPa.

Se describe la membrana porosa utilizada como una membrana de separación en la presente invención.

Se describe la constitución de la membrana porosa utilizada como una membrana de separación en la presente
60
invención. La membrana porosa en la presente invención, preferentemente, tiene rendimiento de separación y rendimiento de permeación de agua dependiendo de la utilización pretendida y la calidad del agua a tratar.

La membrana porosa es, preferentemente, una membrana porosa que contiene una capa de resina porosa desde el punto de vista del rendimiento de prevención, el rendimiento de permeación de agua y el rendimiento de separación,
65
por ejemplo resistencia a la contaminación.

Preferentemente, la membrana porosa que contiene una capa de resina porosa tiene una capa de resina porosa que desempeña un papel en una capa funcional de separación en la superficie de un material de base poroso. El material de base poroso soporta la capa de resina porosa para dotar de resistencia a la membrana de separación.

- 5 La membrana porosa utilizada en la presente invención tiene una capa de resina porosa, preferentemente, en la superficie de un material de base poroso, la capa de resina porosa puede penetrar o no en el material de base poroso, dependiendo de la utilización.

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

- 10 El material del material de base poroso está hecho de un material orgánico y/o un material inorgánico, y de forma deseable se utilizan fibras orgánicas. El material de base poroso es, preferentemente, una tela tejida o no tejida preparada a partir de fibras orgánicas tales como fibras de celulosa, fibras de triacetato de celulosa, fibras de poliéster, fibras de polipropileno y fibras de polietileno. Más preferentemente, de utiliza una tela no tejida de fabricación fácil y económica de densidad regulada de forma relativamente fácil.

- 15 Como la capa de resina porosa, se puede utilizar, preferentemente, una membrana de polímero orgánico. El material de la membrana de polímero orgánico incluye, por ejemplo, una resina de polietileno, resina de polipropileno, resina de cloruro de polivinilo, resina de fluoruro de polivinilideno, resina de polisulfona, resina de poliéter sulfona, resina de poliacrilonitrilo, resina de celulosa y resina de triacetato de celulosa. La membrana de polímero orgánico puede ser una mezcla de resina que contiene estas resinas como el componente principal. El componente principal utilizado en el presente documento se refiere a un componente que está contenido en una cantidad del 50 % en peso o, más preferentemente, el 60 % en peso o más. El material de la membrana de polímero orgánico es una resina que es excelente en cuanto a durabilidad física y resistencia química y cuya solución se puede formar fácilmente en una membrana, tal como una resina de cloruro de polivinilo, resina de fluoruro de polivinilideno, resina de polisulfona, resina de poliéter sulfona o resina de poliacrilonitrilo y una resina de polivinilideno o una resina que contiene las mismas como componente principal son utilizadas de la forma más preferente.

- 20 Como resina de fluoruro de polivinilideno, se utiliza, preferentemente, un homopolímero de fluoruro de vinilideno. Como la resina de fluoruro de polivinilideno, también se puede utilizar, preferentemente, un copolímero de fluoruro de vinilideno y un monómero de vinilo copolimerizable con el mismo. El monómero de vinilo copolimerizable con fluoruro de vinilideno se puede ejemplificar mediante tetrafluoroetileno, hexafluoropropileno y tricloruro de cloruro de etileno.

- 30 Es importante que la membrana porosa utilizada en la presente invención sea de 0,01 μm o más a menos de 1 μm de tamaño de poro promedio. Cuando el tamaño de poro promedio de la membrana porosa es de 0,01 μm o más a menos de 1 μm , la membrana porosa apenas se obstruye con los microorganismos utilizados en la fermentación y tiene un rendimiento de filtración que dura de forma estable durante mucho tiempo. Además, cuando el tamaño de poro promedio de la membrana porosa es de 0,01 μm o más a menos de 1 μm , se evita que se fugue una alta tasa de exclusión en microorganismos o las células cultivadas, y la alta permeabilidad al agua se puede satisfacer simultáneamente, y por lo tanto la permeabilidad el agua se puede mantener durante mucho tiempo con alta precisión y reproducibilidad.

- 40 El tamaño de poro promedio de la membrana porosa es menor de 1 μm , porque cuando el tamaño de poro está cerca del tamaño de un microorganismo o célula cultivada, el poro puede estar directamente obstruido con el microorganismo o célula cultivada. El tamaño de poro promedio de la membrana porosa es, preferentemente, no demasiado grande en comparación con el tamaño de un microorganismo o célula cultivada, para evitar la fuga del microorganismo o célula cultivada, es decir, para evitar una desventaja de la reducción en la tasa de exclusión. Cuando el microorganismo o célula cultivada es una bacteria que tiene una célula pequeña, el tamaño de poro promedio es, preferentemente, 0,4 μm o menos, particularmente menos de 0,2 μm para un funcionamiento más preferente.

- 50 Un microorganismo o las células cultivadas pueden producir sustancias distintas a un producto químico objetivo, por ejemplo sustancias fácilmente agregadas, tales como proteínas y polisacáridos, y una parte de los microorganismos o las células cultivadas en un cultivo pueden perecer para formar células rotas. Para prevenir la obstrucción de la membrana porosa con dichas sustancias, el tamaño de poro promedio es, preferentemente, 0,1 μm o menos.

- Generalmente, el tamaño de poro promedio de la membrana porosa es, preferentemente, 0,4 μm o menos, más preferentemente, menos de 0,2 μm , o 0,1 μm o menos.

- 60 Cuando el tamaño de poro promedio es demasiado pequeño, el rendimiento de permeación de agua de la membrana porosa se puede reducir, haciendo de este modo el funcionamiento eficiente inviable incluso si la membrana no está ensuciada. Por lo tanto, el tamaño de poro promedio de la membrana porosa en la presente invención es 0,01 μm o más, más preferentemente, 0,02 μm o más, aún más preferentemente, 0,04 μm o más.

65

El tamaño de poro promedio se puede determinar midiendo los diámetros de todos los poros observables en un área de $9,2 \mu\text{m} \times 10,4 \mu\text{m}$ bajo observación con un microscopio electrónico de barrido con un aumento de $\times 10.000$ y promediando a continuación los diámetros medidos. Como alternativa, el tamaño de poro promedio se puede determinar haciendo una foto de la superficie de la membrana con un microscopio electrónico de barrido con un aumento de $\times 10.000$, seleccionando a continuación 10 o más (preferentemente, 20 o más) poros al azar, midiendo los diámetros de los poros seleccionados, y promediando en número los diámetros medidos. Cuando el poro no es circular, el tamaño de poro promedio se puede determinar mediante un procedimiento para determinar un círculo que tiene un área equivalente a la del poro con un procesador de imágenes o similar, y suponiendo que el diámetro del círculo equivalente es el diámetro del poro, se determina el tamaño de poro promedio.

La derivación estándar σ del tamaño de poro promedio de la membrana porosa utilizada en la presente invención es, preferentemente, $0,1 \mu\text{m}$ o menos. La desviación estándar del tamaño de poro promedio es de forma deseable inferior. La desviación estándar σ del tamaño de poro promedio se puede calcular utilizando la siguiente ecuación (1):

[Ecuación 1]

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

en la que N es el número de poros observable en el área mencionada anteriormente de $9,2 \mu\text{m} \times 10,4 \mu\text{m}$, X_k es el diámetro de cada uno de los poros medidos, y $X(\text{prom})$ es el tamaño de poro promedio.

Para la membrana porosa utilizada en la presente invención, su permeabilidad a un cultivo es un rendimiento importante. Como un indicador de la permeabilidad de la membrana porosa, se puede utilizar el coeficiente de permeabilidad al agua purificada de la membrana porosa antes de la utilización. En la presente invención, el coeficiente de permeabilidad al agua purificada de la membrana porosa, como se calculó midiendo, a presión de carga hidrostática a 1 m, la cantidad de agua penetrada a 25°C purificada previamente con una membrana de ósmosis inversa, es, preferentemente, no menos de $2 \times 10^{-9} \text{ m}^3/\text{m}^2/\text{s}/\text{Pa}$. Cuando el coeficiente de permeabilidad al agua purificada está en el intervalo de $2 \times 10^{-9} \text{ m}^3/\text{m}^2/\text{s}/\text{Pa}$ o más a $6 \times 10^{-7} \text{ m}^3/\text{m}^2/\text{s}/\text{Pa}$ o menos, se puede alcanzar una cantidad de agua penetrada prácticamente suficiente.

En la membrana porosa utilizada en la presente invención, la rugosidad superficial es la altura promedio en una dirección perpendicular a la superficie. La rugosidad superficial de la membrana es uno de los factores por los cuales los microorganismos o las células cultivadas que se adhieren a la superficie de la membrana de separación se hacen fácilmente eliminables por un efecto de lavado de la superficie de la membrana como resultado de un flujo de líquido bajo agitación o con una bomba de circulación. La rugosidad superficial de la membrana porosa es, preferentemente, $0,1 \mu\text{m}$ o menos. Cuando la rugosidad superficial es $0,1 \mu\text{m}$ o menos, los microorganismos o las células cultivadas adheridas a la membrana son fácilmente eliminables.

Se descubrió que una membrana porosa que tiene una rugosidad superficial de $0,1 \mu\text{m}$ o menos, un tamaño de poro promedio de $0,01 \mu\text{m}$ o más a menos de $1 \mu\text{m}$, y un coeficiente de permeabilidad al agua purificada de no menos de $2 \times 10^{-9} \text{ m}^3/\text{m}^2/\text{s}/\text{Pa}$ se puede utilizar, más preferentemente, para llevar a cabo el funcionamiento más fácilmente sin requerir la potencia excesiva necesaria para lavar la superficie de la membrana. Cuando la rugosidad superficial de la membrana porosa es $0,1 \mu\text{m}$ o menos, la resistencia a la cizalladura generada en la superficie de la membrana tras la filtración de microorganismos o las células cultivadas puede reducirse y, por lo tanto, se puede evitar que los microorganismos se rompan, y también se puede evitar que la membrana porosa se obstruya, lo que permite una filtración más estable durante mucho tiempo. La rugosidad superficial de la membrana porosa es, preferentemente, $0,1 \mu\text{m}$ o menos, de modo que la membrana permite la fermentación continua con una menor diferencia de presión transmembrana, e incluso en caso de obstrucción, es excelente en la recuperación por lavado en comparación con el caso de funcionamiento con una alta diferencia de presión transmembrana. Debido a que la fermentación continua estable se hace factible evitando la obstrucción, la rugosidad superficial de la membrana porosa es, preferentemente, más baja.

La rugosidad superficial de la membrana se midió con el siguiente microscopio de fuerza atómica (AFM) en las siguientes condiciones:

Unidad: microscopio de fuerza atómica (Nanoscope IIIa fabricado por Digital Instruments)

Condiciones

Sonda: SiN cantilever (fabricada por Digital Instruments) Modo de exploración: modo de contacto (medición en aire)

Modo de captación subacuática (medición en agua)

Rango de exploración: 10 µm, 25 µm en un lado (medición en aire) 5 µm, 10 µm en un lado (medición en aire)

Resolución de exploración: 512x512

5 Preparación de una muestra: una muestra de membrana se sumergió en etanol a temperaturas ordinarias durante 15 minutos, después se sumergió en agua RO durante 24 horas, se lavó y se secó al aire antes de la medición.

Desde la altura en la dirección del eje Z en cada punto, se calculó la rugosidad superficial $d_{\text{rugosidad}}$ de la de la membrana con el microscopio de fuerza atómica (AFM) utilizando la siguiente ecuación (2):

10 [Ecuación 2]

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

15 $d_{\text{rugosidad}}$: rugosidad superficial promedio

Z_n : altura en el eje Z

Z: altura promedio en el rango de exploración

La membrana porosa utilizada en la presente invención es, preferentemente, una membrana de lámina plana. Cuando la membrana porosa es una membrana de lámina plana, el grosor promedio de la misma se selecciona dependiendo del uso pretendido. Cuando la membrana porosa es una membrana de lámina plana, el grosor promedio de la misma es, preferentemente, de 20 o más a 5.000 µm o menos, más preferentemente, de 50 o más a 2.000 µm o menos.

La membrana porosa utilizada en la presente invención es, preferentemente, una membrana de fibras huecas. Cuando la membrana porosa es una membrana de fibras huecas, el diámetro interno de las fibras huecas es, preferentemente, de 200 a 5.000 µm, y el grosor de la membrana es, preferentemente, de 20 a 2.000 µm. Una tela o material textil hecho de fibras orgánicas o inorgánicas cilíndricas puede estar contenido en el interior de las fibras huecas.

Un procedimiento de formación de la membrana porosa utilizada en la presente invención se describe con referencia a un esbozo del procedimiento.

A continuación, el procedimiento de formación de una membrana de lámina plana de la membrana porosa se describe brevemente.

Un revestimiento de una solución madre que contiene una resina y un disolvente se forma en la superficie de un material de base poroso, y simultáneamente el material de base poroso se impregna con la solución madre. Posteriormente, solo la superficie, en el lado del revestimiento, del material de base poroso se pone en contacto con un baño de coagulación que contiene un no disolvente, coagulando de este modo la resina y formando simultáneamente una capa de resina porosa en la superficie del material de base poroso.

La solución madre se prepara disolviendo una resina en un disolvente. Desde el punto de vista de la propiedad de fabricación de membranas, generalmente es preferente que la temperatura de la solución madre se seleccione en el intervalo de 5 a 120 °C. El disolvente disuelve una resina y actúa sobre la resina para promover la formación de una capa de resina porosa de la resina. El disolvente que se puede utilizar en el presente documento incluye N-metilpirrolidinona (NMP), N,N-dimetilacetamida (DMAc), N,N-dimetilformamida (DMF), dimetilsulfóxido (DMSO), N-metil-2-pirrolidona, metil etil cetona, tetrahidrofurano, tetrametilurea, trimetilfosfato, ciclohexanona, isoforona, γ-butirolactona, metil isoamil cetona, dimetilftalato, propilenglicol metil éter, carbonato de propileno, diacetona alcohol, triacetato de glicerol, acetona, y metil etil cetona. Entre estos disolventes, se pueden utilizar, preferentemente, N-metilpirrolidinona (NMP), N,N-dimetilacetamida (DMAc), N,N-dimetilformamida (DMF) y dimetilsulfóxido (DMSO), que pueden disolver la resina en gran medida. Estos disolventes se pueden utilizar solos o como una mezcla de dos o más de los mismos.

Por ejemplo, se pueden añadir al disolvente componentes distintos del disolvente, por ejemplo, polietilenglicol, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona y glicerina. También se puede añadir un no disolvente al disolvente. El no disolvente es un líquido que no disuelve la resina. El no disolvente actúa como un regulador del tamaño de poro regulando la velocidad de coagulación de la resina. Como no disolvente, se pueden utilizar agua y alcoholes tales como metanol y etanol. Particularmente, el no disolvente es, preferentemente, agua o metanol desde el punto de vista del precio. El componente distinto del disolvente, y el no disolvente, también pueden ser una mezcla.

También se puede añadir un agente formador de poros a la solución madre. El agente formador de poros tiene una función tal que tras la inmersión en un baño de coagulación, se extrae de una capa de resina para hacer la capa de resina porosa. Añadiendo el agente formador de poros, se puede regular el tamaño de poro promedio de la membrana porosa. Preferentemente, el agente formador de poros es altamente soluble en el baño de coagulación.

5 Entre los ejemplos de los agentes formadores de poros utilizables se incluyen sales inorgánicas, tales como cloruro de calcio y carbonato de calcio. De forma alternativa, como agentes formadores de poros, se pueden utilizar polioxialquilenos, por ejemplo, polietilenglicol y polipropilenglicol; polímeros solubles en agua, por ejemplo, alcohol polivinílico, polivinil butiral y ácidos poliacrílicos; y glicerina.

10 A continuación, se describe brevemente el procedimiento de formación de una membrana de fibras huecas como la membrana porosa.

La membrana de fibras huecas se puede preparar descargando una solución madre hecha de resina y disolvente a través de una tubería externa de una base de doble tubería y descargando simultáneamente un fluido formador de huecos a través de una tubería interna de la base de doble tubería y solidificándolos enfriando en un baño de enfriamiento.

15 La solución madre se puede preparar disolviendo la resina descrita anteriormente en el procedimiento de preparación de una membrana de lámina plana, a una concentración del 20 % o más al 60 % o menos en peso, en el disolvente descrito anteriormente en el procedimiento de preparación de una membrana de lámina plana. El fluido formador de huecos puede ser, generalmente, un gas o líquido. La superficie externa de la membrana de fibras huecas resultante también se puede revestir (laminar) con una nueva capa de resina porosa. Se puede realizar la laminación para cambiar las propiedades (por ejemplo, hidrofilia/hidrofobia, tamaño de poro, etc.) de la membrana de fibras huecas en las propiedades deseadas. La nueva capa de resina porosa a laminar sobre la misma puede prepararse poniendo en contacto la solución madre que tiene una resina disuelta en un disolvente con un baño de coagulación que contiene no disolvente para coagular la resina. Como material de la resina, se puede utilizar, por ejemplo, el mismo material que en la membrana de polímero orgánico. El procedimiento de laminación no está particularmente limitado, y la membrana de fibras huecas se puede sumergir en la solución madre o se le puede revestir con la solución madre, y después de la laminación, una parte de la solución madre adherida se puede raspar o soplar con una cuchilla de aire para regular la cantidad de laminado.

La membrana porosa utilizada en la presente invención se puede formar en un elemento de membrana de separación uniendo/sellando un hueco de la membrana de fibras huecas con un miembro, tal como una resina y disponiendo, a continuación, la membrana sobre un soporte.

35 La membrana porosa utilizada en la presente invención se puede combinar con un soporte para formar un elemento de membrana de separación. El elemento de membrana de separación que tiene una placa de soporte como un soporte en el que la membrana porosa utilizada en la presente invención está dispuesta, como mínimo, en un lado de la placa de soporte, es un modo preferente del elemento de membrana de separación que tiene la membrana porosa utilizada en la presente invención. Un elemento de membrana de separación que tiene la membrana porosa en ambos lados de una placa de soporte para aumentar la cantidad de agua de penetración es también un modo preferente del elemento de membrana de separación.

45 El procedimiento de producción de un producto químico, según la presente invención, incluye filtración con una diferencia de presión transmembrana en el intervalo de 0,1 a 20 kPa. Cuando un cultivo de fermentación se filtra con una diferencia de presión transmembrana de más de 20 kPa, se necesita energía eléctrica para aplicar presión, reduciendo, de este modo, la eficacia económica en la producción de un producto químico. Dada una diferencia de presión transmembrana de más de 20 kPa, un microorganismo o las células cultivadas se pueden romper para reducir la capacidad de producir un producto químico. En el procedimiento de producción de un producto químico, según la presente invención, la diferencia de presión transmembrana, es decir, la presión de filtración está en el intervalo de 0,1 a 20 kPa que se puede alcanzar mediante una diferencia de carga hidrostática, y, por lo tanto, no es necesario que el interior del fermentador se mantenga particularmente bajo presión, de modo que no se reduce la capacidad de producir un producto químico. Debido a que no es necesario que el interior del fermentador se mantenga particularmente bajo presión, la membrana porosa puede disponerse dentro del fermentador, lo que puede dar como resultado otra ventaja para reducir el tamaño del aparato de fermentación. El procedimiento de producción de un producto químico, según la presente invención, incluye filtración con una diferencia de presión transmembrana, preferentemente, en el intervalo de 0,1 a 2 kPa.

60 En el procedimiento de obtención de un producto químico, según la presente invención, se utilizan materiales de fermentación. Los materiales de fermentación utilizados en la presente invención pueden ser cualquier material que promueva el crecimiento de un microorganismo de cultivo para permitir que el microorganismo produzca satisfactoriamente un producto de fermentación objetivo como el producto químico.

65 Los materiales de fermentación utilizados en la presente invención tienen forma, preferentemente, de un medio líquido ordinario que contiene una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno y sales inorgánicas y que contienen de forma adecuada micronutrientes orgánicos, tales como aminoácidos y vitaminas, según sea necesario. La fuente

de carbono que se puede utilizar en el presente documento incluye azúcares, tales como glucosa, sacarosa, fructosa, galactosa y lactosa, azúcares de almidón que contienen estos azúcares, melazas de batata, melazas de remolacha azucarera y melazas de alta resistencia, ácidos orgánicos, tales como ácido acético, alcoholes, tales como etanol y glicerina. La fuente de nitrógeno que se puede utilizar en el presente documento incluye amoníaco gaseoso, agua amoniacal, sales de amonio, urea, nitratos y otras fuentes de nitrógeno orgánico utilizadas de manera secundaria, por ejemplo tortas de aceite, hidrolizados de soja, digestión de caseína, otros aminoácidos, vitaminas, licor de maceración de maíz, levaduras o extracto de levadura, extracto de carne, péptidos tales como peptona y diversos microorganismos de fermentación y sus hidrolizados. Las sales inorgánicas que se pueden añadir adecuadamente incluyen fosfatos, sales de magnesio, sales de calcio, sales de hierro y sales de manganeso.

Cuando los microorganismos utilizados en la presente invención requieren un nutriente específico para su crecimiento, el nutriente se añade como una preparación o como un producto natural que lo contiene. Se utiliza un agente antiespumante si es necesario. El cultivo en la presente invención se refiere a un líquido obtenido como resultado del crecimiento de un microorganismo o las células cultivadas con los materiales de fermentación. La composición de los materiales de fermentación a añadir puede cambiarse adecuadamente a partir de la composición de los materiales de fermentación utilizados al inicio del cultivo.

En la presente invención, la concentración de azúcares en el cultivo se mantiene, preferentemente, a 5 g/l o menos. La razón por la que la concentración de azúcares en el cultivo se mantiene, preferentemente, a 5 g/l o menos es que el flujo de salida de azúcares al retirar el cultivo se puede minimizar a esa concentración.

El microorganismo se cultiva generalmente a pH 4 a 8 a una temperatura en el intervalo de 20 a 40 °C. El pH del cultivo se ajusta a un valor predeterminado generalmente en el intervalo de pH 4 a 8 con un ácido inorgánico u orgánico, una sustancia alcalina, urea, carbonato de calcio, amoníaco gaseoso o similares. Cuando es necesario aumentar la velocidad de suministro de oxígeno, es posible emplear medios para añadir oxígeno al aire para mantener una concentración de oxígeno no inferior al 21 % o medios para presurizar el cultivo o aumentar la velocidad de agitación, o mejorar la aireación.

En el procedimiento de producción de un producto químico, según la presente invención, se puede llevar a cabo un cultivo discontinuo o cultivo discontinuo alimentado en una fase inicial de cultivo para aumentar la densidad de microorganismos, seguido por cultivo continuo (retirada). En el procedimiento de producción de un producto químico, según la presente invención, la densidad de los microorganismos se puede aumentar, seguido por la siembra de una alta densidad de microorganismos, iniciando de este modo el cultivo y al mismo tiempo llevando a cabo el cultivo continuo. En el procedimiento de producción de un producto químico, según la presente invención, el suministro del cultivo de partida y la retirada del cultivo se puede iniciar en una fase adecuada. El momento de iniciar el suministro del cultivo de partida y el momento de iniciar la retirada del cultivo pueden no ser siempre los mismos. El suministro del cultivo de partida y la retirada del cultivo se puede llevar a cabo de forma continua o intermitente.

Los nutrientes necesarios para el crecimiento del microorganismo se pueden añadir al cultivo de inicio para que el microorganismo crezca de forma continua. Para lograr una productividad eficiente, la densidad de los microorganismos o las células cultivadas en el cultivo se mantiene, preferentemente, alta en un intervalo en el que el entorno del cultivo no es inadecuado para que el crecimiento de los microorganismos o las células cultivadas cause una alta tasa de mortalidad. A modo de ejemplo, los microorganismos o las células cultivadas en el cultivo mantenidas a una densidad no inferior a 5 g/l en peso seco han hecho posible, de este modo, una excelente eficiencia de producción.

En el procedimiento de producción de un producto químico, según la presente invención, los microorganismos o las células cultivadas pueden retirarse del fermentador, según sea necesario. Debido a que la membrana de separación se obstruye fácilmente, por ejemplo, cuando la densidad de los microorganismos o las células cultivadas en el fermentador se vuelve demasiado alta, se puede evitar dicha obstrucción mediante la retirada. El rendimiento de producción de un producto químico puede variar según la densidad de los microorganismos o las células cultivadas en el fermentador, y el rendimiento productivo se puede mantener retirando los microorganismos o las células cultivadas con el rendimiento productivo como indicador.

En el procedimiento de producción de un producto químico, según la presente invención, el número de fermentadores no está limitado, siempre que la operación de cultivo continuo durante el cual se cultivan los microorganismos frescos capaces de fermentar se realice mediante un procedimiento de cultivo continuo en el que los microorganismos se cultivan y simultáneamente se forma un producto. En el procedimiento de producción de un producto químico, según la presente invención, es preferente para el control del cultivo que la operación de cultivo continuo se lleve a cabo generalmente en un solo fermentador. Sin embargo, se pueden utilizar una pluralidad de fermentadores por razones tales como una pequeña capacidad del fermentador. En este caso, una pluralidad de fermentadores se pueden conectar en paralelo, o en serie, en fermentación continua para lograr una alta productividad del producto de fermentación.

A continuación, se describen los microorganismos o las células cultivadas que se pueden utilizar en el procedimiento de producción de un producto químico, según la presente invención. Los microorganismos o las células cultivadas

que se pueden utilizar en el procedimiento de producción de un producto químico, según la presente invención, no están limitados. Los microorganismos o las células cultivadas utilizados en la presente invención incluyen, por ejemplo, levaduras tales como levadura de panadería (*Saccharomyces cerevisiae*) utilizadas frecuentemente en la industria de la fermentación, bacterias, tales como *Escherichia coli* o bacterias corineformes, bacterias filamentosas, micobacterias, células animales y células de insecto. Los microorganismos o células utilizados pueden ser los aislados del entorno natural o los que tienen propiedades modificadas parcialmente por mutación o recombinación genética.

El producto químico producido mediante el procedimiento de producción de un producto químico, según la presente invención no está limitado siempre que sea una sustancia producida en un cultivo por los microorganismos o células descritos anteriormente. El producto químico producido mediante el procedimiento de producción de un producto químico según la presente invención incluye sustancias, tales como alcoholes, ácidos orgánicos, aminoácidos y ácido nucleico que se producen en grandes cantidades en la industria de la fermentación. Los ejemplos de dichos productos químicos incluyen alcoholes tales como etanol, 1,3-propanodiol, 1,4-butanodiol y glicerol, ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido láctico, ácido pirúvico, ácido succínico, ácido málico, ácido itacónico y ácido cítrico, ácidos nucleicos, por ejemplo nucleósidos, tales como inosina y guanosina y nucleótidos, tales como ácido inosínico y ácido guanílico, y compuestos de diamina tales como cadaverina. La presente invención también se puede aplicar a la producción de sustancias tales como enzimas, antibióticos y proteínas recombinantes.

A continuación, se describen los microorganismos o las células cultivadas que se pueden utilizar en el procedimiento de producción de un producto químico, según la presente invención, con referencia a productos químicos específicos.

En el procedimiento de producción de un producto químico, según la presente invención, los microorganismos o las células cultivadas que se pueden utilizar en la producción de ácido L-láctico no están particularmente limitados, siempre que sean microorganismos capaces de producir ácido L-láctico. En el procedimiento de producción de un producto químico, según la presente invención, los microorganismos o las células cultivadas que se pueden utilizar en la producción de ácido L-láctico son, preferentemente, bacterias del ácido láctico. Las bacterias del ácido láctico, tal como se utilizan en el presente documento, pueden definirse como microorganismos procariotas que producen un 50 % o más de ácido láctico como rendimiento respecto a azúcar (glucosa consumida). Entre los ejemplos preferentes de bacterias del ácido láctico se incluyen bacterias del ácido láctico que pertenecen al género *Lactobacillus*, género *Pediococcus*, género *Tetragenococcus*, género *Carnobacterium*, género *Vagococcus*, género *Leuconostoc*, género *Oenococcus*, género *Atopobium*, género *Streptococcus*, género *Enterococcus*, género *Lactococcus* y género *Bacillus*. Entre ellas, las bacterias del ácido láctico que tienen un alto rendimiento de ácido láctico respecto a azúcar pueden seleccionarse y utilizarse, preferentemente, en la producción de ácido láctico. En el procedimiento de producción de un producto químico, según la presente invención, las bacterias del ácido láctico que tienen un alto rendimiento de ácido láctico, particularmente ácido L-láctico, pueden seleccionarse y utilizarse, preferentemente, en la producción de ácido láctico. El ácido L-láctico es un tipo de isómero óptico del ácido láctico y se puede distinguir claramente de su enantiómero ácido D-láctico. Entre los ejemplos de bacterias del ácido láctico que tienen un alto rendimiento de ácido L-láctico respecto a azúcar se incluyen *Lactobacillus yamanashiensis*, *Lactobacillus animalis*, *Lactobacillus agilis*, *Lactobacillus aviaries*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbruekii*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus ruminis*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus sharpeae*, *Pediococcus dextrinicus* y *Lactococcus lactis*, y estos pueden seleccionarse para producir ácido L-láctico.

Cuando el ácido L-láctico se produce mediante el procedimiento de producción de un producto químico, según la presente invención, se pueden utilizar los microorganismos o las células cultivadas que se dotaron artificialmente de la capacidad de producir ácido láctico o a los que se permitió mejorar la misma. Por ejemplo, se pueden utilizar microorganismos o las células cultivadas en las que se introdujo un gen de L-lactato deshidrogenasa (en lo sucesivo, a veces denominada L-LDH) para conferir o mejorar la capacidad de producir ácido L-láctico. El procedimiento para conferir o mejorar la capacidad de producir ácido L-láctico también puede ser un procedimiento de mutagénesis química conocido en la técnica. El microorganismo es, preferentemente, un microorganismo recombinante cuya capacidad para producir ácido L-láctico se mejoró mediante la integración de L-LDH. Cuando el ácido L-láctico se produce mediante el procedimiento de producción de un producto químico, según la presente invención, un huésped de microorganismo recombinante es, preferentemente, *Escherichia coli* o una bacteria del ácido láctico que es una célula procariota o levadura que es una célula eucariota, de forma particularmente preferente una levadura. La levadura es, preferentemente, una levadura perteneciente al género *Saccharomyces*, más preferentemente, *Saccharomyces cerevisiae*.

La L-LDH utilizada en la presente invención no está limitada siempre que codifique una proteína que tenga una actividad de conversión de nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) reducido y ácido pirúvico en nicotinamida adenina dinucleótido oxidado (NAD⁺) y ácido L-láctico. Por ejemplo, se puede utilizar L-LDH derivada de bacterias del ácido láctico que tienen un alto rendimiento de ácido L-láctico respecto a azúcar., preferentemente, se puede utilizar L-LDH derivada de mamífero. Particularmente se puede utilizar L-LDH derivada de *Homo sapiens* o rana. La L-LDH derivada de rana que se puede utilizar en la presente invención es particularmente preferente L-LDH derivada de una rana que pertenece a la familia *Pipidae*, más preferentemente, L-LDH derivada de *Xenopus laevis* que es una rana que pertenece a la familia *Pipidae*.

La L-LDH derivada de ser humano o de rana utilizada en la presente invención incluye genes de tipo mutante resultantes de polimorfismo genético, mutagénesis o similares. El polimorfismo genético se refiere a un cambio parcial en una secuencia de nucleótidos de un gen por mutación espontánea en el gen. La mutagénesis se refiere a la introducción artificial de una mutación en un gen. La mutagénesis se puede lograr, por ejemplo, mediante un procedimiento de utilización de un kit para mutagénesis dirigida (Mutan-K fabricado por Takara Bio) o un procedimiento de utilización de un kit para mutagénesis aleatoria (BD Diversify PCR Random Mutagenesis fabricado por CLONTECH). La L-LDH derivada de ser humano o de rana utilizada en la presente invención puede tener una delección o inserción en una parte de su secuencia de nucleótidos, siempre que codifique una proteína que tenga una actividad de conversión de NADH y ácido pirúvico en NAD⁺ y ácido L-láctico.

Cuando el ácido L-láctico se produce mediante el procedimiento de producción de un producto químico, según la presente invención, la separación y purificación del ácido L-láctico contenido en el licor de fermentación filtrado/separado producido se puede llevar a cabo mediante una combinación de procedimientos conocidos convencionalmente, tales como concentración, destilación y cristalización. Entre sus ejemplos se incluyen un procedimiento que implica bajar el pH del licor de fermentación filtrado/separado a 1 o menos y, a continuación, extraer ácido L-láctico con dietil éter, acetato de etilo o similar, un procedimiento que implica adsorber el licor de fermentación en una resina de intercambio iónico, lavar la resina y eluir el ácido L-láctico, un procedimiento que implica hacer reaccionar ácido L-láctico en el licor de fermentación con un alcohol en presencia de un catalizador ácido para convertirlo en el éster correspondiente seguido de su destilación, y un procedimiento que implica cristalizar el ácido L-láctico como una sal de calcio o una sal de litio. Preferentemente, una solución de ácido L-láctico concentrado obtenida evaporando agua del licor de fermentación filtrado/separado puede someterse a destilación. En la destilación, la solución original a destilar se somete a destilación, preferentemente, mientras que se alimenta agua a la misma de manera que la concentración de agua de la solución se mantiene constante. Una solución acuosa de ácido L-láctico obtenida mediante destilación se puede concentrar evaporando el agua de la misma calentando para dar una concentración objetivo de ácido L-láctico purificado. Cuando se obtiene una solución acuosa de ácido L-láctico que contiene componentes de bajo punto de ebullición, tales como etanol y ácido acético, como un destilado, los componentes de bajo punto de ebullición se eliminan, preferentemente, en una etapa de concentración de ácido L-láctico. Después de la operación de destilación, el destilado también se puede purificar con una resina de intercambio iónico o carbón activado, mediante separación cromatográfica o similar, según sea necesario para eliminar las impurezas, para dar ácido L-láctico de mayor pureza.

Cuando el ácido D-láctico se produce mediante el procedimiento de producción de un producto químico, según la presente invención, los microorganismos o las células cultivadas que se pueden utilizar en la producción de ácido D-láctico no están limitados siempre que puedan producir ácido D-láctico. Los microorganismos o las células cultivadas que se pueden utilizar en la producción de ácido D-láctico incluyen, por ejemplo, microorganismos que pertenecen a la cepa de tipo silvestre de los géneros *Lactobacillus*, *Bacillus* y *Pediococcus* que tienen capacidad de sintetizar ácido D-láctico.

Cuando se produce ácido D-láctico mediante el procedimiento de producción de un producto químico, según la presente invención, los microorganismos o las células cultivadas utilizados son, preferentemente, aquellos en los que la actividad enzimática de la D-lactato deshidrogenasa (en lo sucesivo, a veces denominada D-LDH) de la cepa de tipo silvestre se ha aumentado. El procedimiento de aumento de la actividad enzimática también puede ser un procedimiento de mutagénesis química conocido en la técnica. Más preferentemente, el microorganismo es un microorganismo recombinante en el que la actividad enzimática de la D-lactato deshidrogenasa se ha aumentado mediante la integración de un gen que codifica D-lactato deshidrogenasa. Cuando se produce ácido D-láctico mediante el procedimiento de producción de un producto químico, según la presente invención, una gran cantidad del microorganismo recombinante es *Escherichia coli* o una bacteria del ácido láctico que es una célula procariota o levadura que es una célula eucariótica, de forma particularmente preferente, levadura.

Cuando se produce ácido D-láctico mediante el procedimiento de producción de un producto químico, según la presente invención, el gen que codifica D-lactato deshidrogenasa es, preferentemente, un gen derivado de *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus acidilactici* o *Bacillus laevolacticus*, más preferentemente, un gen derivado de *Bacillus laevolacticus*.

Cuando se produce ácido D-láctico mediante el procedimiento de producción de un producto químico, según la presente invención, la separación y purificación de ácido D-láctico contenido en el licor de fermentación filtrado/separado se puede llevar a cabo mediante una combinación de procedimientos conocidos de forma convencional, tales como concentración, destilación y cristalización. Entre sus ejemplos se incluyen un procedimiento que implica bajar el pH del licor de fermentación filtrado/separado a 1 o menos y, a continuación, extraer ácido D-láctico con dietil éter, acetato de etilo o similar, un procedimiento que implica adsorber el licor de fermentación sobre una resina de intercambio iónico, lavar la resina y eluir ácido D-láctico, un procedimiento que implica hacer reaccionar ácido D-láctico en el licor de fermentación con un alcohol en presencia de un catalizador de ácido para convertirlo en el éster correspondiente seguido de su destilación, y un procedimiento que implica cristalizar el ácido D-láctico como una sal de calcio o una sal de litio. Preferentemente, una solución concentrada de ácido D-láctico obtenida por evaporación de agua del licor de fermentación filtrado/separado puede someterse a

destilación cuando el ácido D-láctico se produce mediante el procedimiento de producción de un producto químico, según la presente invención. En la destilación, la solución original a destilar se somete a destilación, preferentemente, mientras que se alimenta agua a la misma de modo que la concentración de agua de la solución se mantiene constante. Una solución acuosa de ácido D-láctico obtenida por destilación puede concentrarse evaporando el agua de la misma calentando para obtener una concentración objeto de ácido D-láctico purificado. Cuando se obtiene una solución acuosa de ácido D-láctico que contiene componentes de bajo punto de ebullición (etanol, ácido acético, etc.) como destilado, los componentes de bajo punto de ebullición se eliminan, preferentemente, en una etapa de concentración del ácido D-láctico. Después de la operación de destilación, el destilado también se puede purificar con una resina de intercambio iónico o carbón activado, mediante separación cromatográfica o similares, según sea necesario para eliminar las impurezas, para dar ácido D-láctico de mayor pureza.

Cuando se produce etanol mediante el procedimiento de producción de un producto químico, según la presente invención, los microorganismos o las células cultivadas que se pueden utilizar en la producción de etanol no están limitados siempre que sean el microorganismo o las células cultivadas que pueden producir ácido pirúvico. Los microorganismos o las células cultivadas que se pueden utilizar en la producción de etanol incluyen, por ejemplo, microorganismos que pertenecen al género *Saccharomyces*, género *Kluyveromyces* y género *Schizosaccharomyces*. Entre ellos, se pueden utilizar, preferentemente, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis* y *Schizosaccharomyces pombe*. También se pueden utilizar microorganismos que pertenecen al género *Lactobacillus* y al género *Zymomonas*. Entre ellos, se pueden utilizar, preferentemente, *Lactobacillus brevis* y *Zymomonas mobilis*.

Los microorganismos o las células cultivadas que se pueden utilizar en la producción de etanol en la presente invención pueden ser microorganismos o las células cultivadas que tienen una capacidad, aumentada artificialmente para producir etanol. Específicamente, los microorganismos o las células cultivadas que se pueden utilizar en la producción de etanol en la presente invención pueden ser aquellos que tienen propiedades modificadas parcialmente por mutación o recombinación genética. Entre los ejemplos de microorganismos o las células cultivadas que tienen propiedades parcialmente modificadas se incluyen levaduras dotadas de la capacidad de asimilar almidón en bruto mediante la integración de un gen de glucoamilasa derivado de un moho que pertenece al género *Rhizopus* ("Biseibutsu (Microorganism)", 3: 555-564 (1987)). Se puede utilizar, preferentemente, un procedimiento de purificación utilizando destilación o un procedimiento de concentración/purificación utilizando membrana NF, RO o membrana de separación de zeolita en la separación y purificación del etanol contenido en el licor de fermentación filtrado/separado producido mediante el procedimiento de producción de la presente invención.

Cuando el ácido pirúvico se produce mediante el procedimiento de producción de un producto químico, según la presente invención, los microorganismos o las células cultivadas que se pueden utilizar en la producción de ácido pirúvico no están limitados siempre que sean microorganismos o las células cultivadas que puedan producir ácido pirúvico. Los microorganismos o las células cultivadas que se pueden utilizar, preferentemente, en la producción de ácido pirúvico incluyen, por ejemplo, microorganismos que pertenecen al género *Pseudomonas*, género *Corynebacterium*, género *Escherichia* y género *Acinetobacter*. Más preferentemente, se pueden utilizar microorganismos, tales como *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*. También se pueden utilizar microorganismos recombinantes creados sometiendo estos microorganismos a mutación o recombinación genética para modificar parcialmente sus propiedades. Por ejemplo, también se utilizan aquellos microorganismos en los que se mutó o delecionó un gen de ATPasa implicado directamente en la producción de ATP por fosforilación oxidativa. También se pueden utilizar, preferentemente, mohos y levaduras. Por ejemplo, se pueden utilizar mohos y levaduras pertenecientes al género *Saccharomyces*, género *Tolulopsis*, género *Candida* y género *Schizophyllum*. Más preferentemente, se pueden utilizar hongos y levaduras, tales como *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces copis*, *Candida glabrata*, *Candida lipolytica*, *Tolulopsis glabrata* y *Schizophyllum commune* para producir ácido pirúvico.

Cuando el ácido pirúvico se produce mediante el procedimiento de producción de un producto químico, según la presente invención, la separación y purificación del ácido pirúvico contenido en el licor de fermentación filtrado/separado se puede llevar a cabo mediante un procedimiento que utiliza una columna de intercambio aniónico. Por ejemplo, se puede utilizar, preferentemente, un procedimiento de purificación que utiliza un intercambiador de iones débilmente halófito mostrado en el documento JP-A No. 6-345683.

Cuando se produce ácido succínico mediante el procedimiento de producción de un producto químico, según la presente invención, los microorganismos o las células cultivadas que se pueden utilizar en la producción de ácido succínico no están limitados siempre que sean microorganismos o las células cultivadas que puedan producir ácido succínico. Los microorganismos o las células cultivadas que se pueden utilizar, preferentemente, en la producción de ácido succínico incluyen, por ejemplo, microorganismos que pertenecen a los géneros *Anaerobiospirillum* y *Actinobacillus*. Entre los ejemplos específicos de dichos microorganismos se incluyen *Anaerobiospirillum succiniciproducens* descritos en la patente de Estados Unidos No. 5143833 y *Actinobacillus succinogenes* descritos por James B. McKinlay, y otros. (Appl. Microbiol. Biotechnol., 71, 6651-6656 (2005)). También se pueden utilizar bacterias corineformes de los géneros *Corynebacterium* y *Brevibacterium*, y *Escherichia*. Las bacterias corineformes son las bacterias *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium flavum* y *Brevibacterium lactofermentum*.

Los microorganismos pueden ser aquellos que tienen una capacidad de producción de ácido succínico mejorada por recombinación genética, por lo que puede mejorarse la productividad del ácido succínico. Entre los ejemplos de los microorganismos que se pueden utilizar en el presente documento se incluyen *Brevibacterium flavum* MJ233AB-41 deficiente en lactato deshidrogenasa (FERM BP-1498) descrito en el documento JP-A No. 2005-27533, *Corynebacterium glutamicum* descrito en el documento no de patente 1, y las cepas de *Escherichia coli* AFP111 deficientes en piruvato formiato liasa y lactato deshidrogenasa descritas en la patente de Estados Unidos No. 5770435.

Cuando se produce ácido succínico mediante el procedimiento de producción de un producto químico, según la presente invención, se puede aplicar un procedimiento habitual de purificación de ácido succínico a la separación y purificación de ácido succínico. Por ejemplo, se puede utilizar, preferentemente, un procedimiento de purificación para combinar el tratamiento de electrodiálisis por hidrólisis y la concentración/cristalización al vacío que se muestra en el documento JP-A No. 2005-333886.

Cuando se produce ácido itacónico mediante el procedimiento de producción de un producto químico, según la presente invención, los microorganismos o las células cultivadas que se pueden utilizar en la producción de ácido itacónico no están limitados siempre que sean microorganismos o las células cultivadas que puedan producir ácido itacónico. Los microorganismos o las células cultivadas que se pueden utilizar, preferentemente, en la producción de ácido itacónico incluyen mohos y levaduras. Más preferentemente, se utilizan mohos que pertenecen al género *Aspergillus* o géneros *Ustilago*, o levaduras que pertenecen al género *Candida* o género *Rhodotorula*, en la producción de ácido itacónico. En particular, se pueden utilizar, preferentemente, mohos tales como *Aspergillus terreus*, *Aspergillus itaconicus*, *Ustilago maydis*, *Ustilago cynodontis* y *Ustilago rabenhorstina*, o *Candida antarctica* en la producción de ácido itacónico.

Cuando se produce ácido itacónico mediante el procedimiento de producción de un producto químico, según la presente invención, la separación y purificación del ácido itacónico se pueden llevar a cabo utilizando ultrafiltración y electrodiálisis. Por ejemplo, se puede utilizar, preferentemente, un procedimiento de purificación mediante ultrafiltración y electrodiálisis con una membrana de resina de intercambio catiónico de tipo sal mostrada en la publicación de patente japonesa No. 50958.

Cuando se produce 1,3-propanodiol mediante el procedimiento de producción de un producto químico, según la presente invención, los microorganismos o las células cultivadas que se pueden utilizar en la producción de 1,3-propanodiol no están limitados siempre que sean microorganismos o las células cultivadas que puedan producir 1,3-propanodiol. Los microorganismos o las células cultivadas que se pueden utilizar, preferentemente, en la producción de 1,3-propanodiol incluyen, por ejemplo, cepas de tipo silvestre tales como microorganismos que pertenecen a los géneros *Klebsiella*, *Clostridium* y *Lactobacillus* que tienen capacidad de producir 1,3-propanodiol a partir de glicerol.

Cuando se produce 1,3-propanodiol mediante el procedimiento de producción de un producto químico, según la presente invención, el microorganismo contiene, preferentemente, (a) como mínimo, un gen que codifica un polipéptido que tiene una actividad glicerol deshidratasa; (b) como mínimo, un gen que codifica un factor de reactivación de glicerol deshidratasa; y (c) como mínimo, un gen que codifica una actividad catalítica inespecífica de convertir 3-hidroxipropionaldehído en 1,3-propanodiol. En la presente invención, el microorganismo es de forma particularmente preferente un microorganismo recombinante que permite la producción de 1,3-propanodiol.

Cuando se produce 1,3-propanodiol mediante el procedimiento de producción de un producto químico, según la presente invención, el microorganismo que tiene capacidad de producir 1,3-propanodiol a partir de glicerol es, preferentemente, un microorganismo recombinante seleccionado del grupo que comprende *Klebsiella*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Cytobacter*, *Enterobacter*, *Aerobacter*, *Aspergillus*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Pichia*, *Kluyveromyces*, *Candida*, *Hansenula*, *Debaryomyces*, *Mucor*, *Torulopsis*, *Methylobacter*, *Salmonella*, *Bacillus*, *Aerobacter*, *Streptomyces*, *Escherichia* y *Pseudomonas*, y, más preferentemente, es *Escherichia coli*.

Cuando se produce 1,3-propanodiol mediante el procedimiento de producción de un producto químico, según la presente invención, el microorganismo recombinante se modifica, preferentemente, para permitir la producción de 1,3-propanodiol eficientemente a partir de glucosa. Por ejemplo, el microorganismo recombinante es, preferentemente, un microorganismo recombinante que contiene (a) como mínimo, un gen que codifica un polipéptido que tiene actividad glicerol-3-fosfato deshidrogenasa y (b) como mínimo, un gen que codifica un polipéptido que tiene actividad glicerol-3-fosfatasa, y es, más preferentemente, un microorganismo recombinante que contiene un gen en el que un factor de activación de glicerol deshidratasa está codificado por orfX y orfZ aislados a partir de un regulón dha. El microorganismo recombinante es, todavía más preferentemente, un microorganismo recombinante deficiente en actividad glicerol quinasa y/o actividad glicerol deshidrogenasa y/o actividad triosa fosfato isomerasa.

Cuando se produce 1,3-propanodiol mediante el procedimiento de producción de un producto químico, según la

presente invención, la separación y purificación de 1,3-propanodiol contenido en el licor de fermentación filtrado/separado se puede llevar a cabo mediante concentración y cristalización. Por ejemplo, se puede utilizar, preferentemente, un procedimiento de purificación utilizando concentración bajo presión reducida y recrystalización mostrado en el documento JP-A No. 35785.

Cuando se produce cadaverina mediante el procedimiento de producción de un producto químico, según la presente invención, los microorganismos o las células cultivadas que se pueden utilizar en la producción de cadaverina no están limitados siempre que sean microorganismos o las células cultivadas que puedan producir cadaverina. Los microorganismos o las células cultivadas que se pueden utilizar, preferentemente, en la producción de cadaverina incluyen, por ejemplo, microorganismos que tienen una actividad enzimática aumentada de una lisina descarboxilasa y/o un antiportador de lisina-cadaverina. Los microorganismos son, más preferentemente, microorganismos recombinantes en los que se han integrado genes que codifican una lisina descarboxilasa y/o un antiportador de lisina-cadaverina. Los microorganismos recombinantes son, todavía más preferentemente, aquellos en los que se han integrado uno o más tipos de genes que codifican una lisina descarboxilasa.

Cuando se produce cadaverina mediante el procedimiento de producción de un producto químico, según la presente invención, los microorganismos recombinantes son, preferentemente, *Escherichia coli* y bacterias corineformes, más preferentemente, bacterias corineformes que tienen actividad lisina descarboxilasa y que tienen, como mínimo, una propiedad seleccionada de auxotrofia de homoserina y resistencia a S-(2-aminoetil)-L-cisteína. Los microorganismos son, más preferentemente, aquellos deficientes en actividad homoserina deshidrogenasa, incluso, preferentemente, aquellos que se hicieron deficientes en actividad homoserina deshidrogenasa mediante mutación con un gen insertado. En la presente invención, el género de bacterias corineformes es, preferentemente, como mínimo, un género seleccionado del grupo que comprende los géneros *Corynebacterium* y *Brevibacterium*. El microorganismo es, más preferentemente, *Corynebacterium glutamicum*.

Cuando se produce cadaverina mediante el procedimiento de producción de un producto químico, según la presente invención, la separación y purificación de la cadaverina contenida en el licor de fermentación filtrado/separado se puede llevar a cabo mediante una combinación de procedimientos conocidos en la técnica, tales como concentración, destilación y cristalización. Por ejemplo, se puede utilizar, preferentemente, un procedimiento de purificación utilizando la cristalización que se muestra en el documento JP-A No. 2004-222569. Dependiendo del ácido utilizado en el cultivo continuo, el producto en la presente invención se puede utilizar como material de diversos polímeros, y cuando el producto se utiliza como material polimérico que requiere alta pureza se utiliza, preferentemente, un procedimiento de purificación utilizando cristalización. Cuando el pH del cultivo se mantiene con ácido clorhídrico, el diclorhidrato de cadaverina se puede recuperar del filtrado mediante una etapa de cristalización. Es más preferente que el pH del cultivo se mantenga con un ácido dicarboxílico durante el cultivo continuo y, a partir del filtrado, se puede recuperar dicarboxilato de cadaverina mediante una etapa de cristalización. El ácido dicarboxílico es, más preferentemente, un ácido dicarboxílico alifático y/o aromático que tiene dos grupos carboxilo solo como sus grupos funcionales. El ácido dicarboxílico es, todavía más preferentemente, ácido adípico, ácido sebácico, ácido 1,12-dodecanodicarboxílico, ácido succínico, ácido isoftálico o ácido tereftálico.

Cuando se produce un ácido nucleico mediante el procedimiento de producción de un producto químico, según la presente invención, los microorganismos o las células cultivadas que se pueden utilizar en la producción de un ácido nucleico no están limitados siempre que sean microorganismos capaces de producir un ácido nucleico. Los microorganismos o las células cultivadas que se pueden utilizar en la producción de un ácido nucleico pueden ser aquellos que tienen inherentemente una alta capacidad de producción de ácido nucleico separado del mundo natural, o pueden ser microorganismos procariotas que tienen una capacidad de producción artificialmente aumentada. Específicamente, los microorganismos pueden ser aquellos que tienen propiedades modificadas parcialmente por mutación o recombinación genética.

A continuación, se describe la modificación de una parte de las propiedades. Para la producción eficiente de un ácido nucleico, el ácido nucleico debe ser biosintetizado, acumulado y liberado fuera del microorganismo. Por consiguiente, se pueden crear microorganismos o las células cultivadas que producen eficientemente un ácido nucleico mediante el aumento de una enzima implicada en una ruta de biosíntesis de ácido nucleico, la reducción de la actividad de una enzima implicada en una ruta de descomposición de ácido nucleico y modificaciones a una proteína implicada en la liberación de un ácido nucleico a partir del microorganismo o a una composición de una membrana biológica.

Específicamente, cuando se produce inosina, la modificación de una parte de las propiedades se realiza de tal manera que la actividad adenilosuccinato sintasa se haga de forma deseable libre o débil; una actividad inosinato deshidrogenasa es de forma deseable libre o débil; y una actividad nucleosidasa es de forma deseable libre o débil. Cuando se produce guanósina, una actividad adenilosuccinato sintasa es de forma deseable libre o débil; una actividad guanilato reductasa es de forma deseable libre o débil; una actividad nucleosidasa es de forma deseable libre o débil; y una actividad nucleotidasa es de forma deseable libre o débil. Cuando se produce uridina, una actividad uridina fosforilasa es de forma deseable libre o débil. Cuando se produce citidina, una actividad citidina desaminasa es de forma deseable libre o débil, y una homoserina deshidrogenasa es de forma deseable libre o débil.

Cuando se produce un ácido nucleico mediante el procedimiento de producción de un producto químico, según la presente invención, los microorganismos o las células cultivadas que se pueden utilizar en él son, preferentemente, bacterias corineformes y *Bacillus subtilis*. Las bacterias corineformes incluyen bacterias que pertenecen al género *Corynebacterium*. Las bacterias del género *Corynebacterium* que se pueden utilizar, preferentemente, incluyen *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium ammoniagenes*, *Corynebacterium guanofaciens* y *Corynebacterium petrophilium*. *Bacillus subtilis* incluye bacterias que pertenecen al género *Bacillus*. Entre aquellas del género *Bacillus*, se utilizan, preferentemente, *Bacillus subtilis*, *Bacillus liqueniformis* y *Bacillus pumilus*. Cuando se produce guanosina, las bacterias corineformes utilizadas en el presente documento incluyen bacterias que pertenecen al género *Corynebacterium*. Entre aquellas del género *Corynebacterium*, es preferente *Corynebacterium glutamicum*, y *Bacillus subtilis* incluye bacterias que pertenecen al género *Bacillus*. Entre aquellas del género *Bacillus*, se utilizan, preferentemente, *Bacillus subtilis*, *Bacillus liqueniformis* y *Bacillus pumilus*. Cuando se produce uridina, se puede utilizar *Bacillus subtilis*, y entre las bacterias de *Bacillus subtilis*, se utilizan, preferentemente, bacterias que pertenecen al género *Bacillus*. Entre aquellas del género *Bacillus*, se utiliza, preferentemente, *Bacillus subtilis*.

Cuando se produce un ácido nucleico mediante el procedimiento de producción de un producto químico, según la presente invención, la separación y purificación de un ácido nucleico contenido en el licor de fermentación filtrado/separado se pueden llevar a cabo, preferentemente, mediante una combinación de tratamiento con resina de intercambio iónico, recristalización por concentración/enfriamiento, separación por membrana y otros procedimientos. Para eliminar las impurezas, se puede utilizar la adsorción y recristalización de carbón activado convencional en la purificación.

Cuando se produce un aminoácido mediante el procedimiento de producción de un producto químico, según la presente invención, los microorganismos o las células cultivadas que se pueden utilizar en la producción de un aminoácido no están limitados siempre que sean microorganismos que puedan producir un aminoácido. Los microorganismos o las células cultivadas que se pueden utilizar en la producción de un aminoácido pueden ser aquellos que originalmente tienen una alta capacidad de producción de aminoácidos separados del mundo natural o pueden ser microorganismos o las células cultivadas que tienen una capacidad de producción artificialmente mejorada. Cuando se produce un aminoácido mediante el procedimiento de producción de un producto químico, según la presente invención, el aminoácido es, preferentemente, L-treonina, L-lisina, ácido L-glutámico, L-triptófano, L-isoleucina, L-glutamina, L-arginina, L-alanina, L-histidina, L-prolina, L-fenilalanina, ácido L-aspartico, L-tirosina, metionina, serina, valina o leucina.

A continuación, los microorganismos o las células cultivadas que se pueden utilizar en la producción de un aminoácido se describen acerca de aminoácidos específicos. Cuando se produce L-treonina mediante el procedimiento de producción de un producto químico, según la presente invención, los microorganismos o las células cultivadas que se pueden utilizar en la producción de L-treonina pueden ser un microorganismo que pertenece a un género seleccionado del género *Escherichia*, género *Providencia*, género *Corynebacterium*, género *Brevibacterium* y género *Serratia*. Entre ellos, son bacterias particularmente preferentes *Escherichia coli*, *Providencia rettgeri*, *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium flavum*, *Brevibacterium lactofermentum* y *Serratia marcescens*.

Cuando se produce L-lisina mediante el procedimiento de producción de un producto químico, según la presente invención, los microorganismos o las células cultivadas que se pueden utilizar en la producción de L-lisina son, preferentemente, *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium flavum* y *Brevibacterium lactofermentum*. Cuando se produce ácido L-glutámico mediante el procedimiento de producción de un producto químico, según la presente invención, los microorganismos o las células cultivadas que se pueden utilizar en la producción de ácido L-glutámico son, preferentemente, *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium flavum* y *Brevibacterium lactofermentum*.

Cuando se produce L-triptófano mediante el procedimiento de producción de un producto químico, según la presente invención, los microorganismos o las células cultivadas que se pueden utilizar en la producción de L-triptófano son, preferentemente, *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium flavum*, *Brevibacterium lactofermentum*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* y *Escherichia coli*.

Cuando se produce L-isoleucina mediante el procedimiento de producción de un producto químico, según la presente invención, los microorganismos o las células cultivadas que se pueden utilizar en la producción de L-isoleucina son, preferentemente, *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium flavum*, *Brevibacterium lactofermentum* y *Serratia marcescens*.

Cuando se produce L-glutamina mediante el procedimiento de producción de un producto químico, según la presente invención, los microorganismos o las células cultivadas que se pueden utilizar en la producción de L-glutamina son, preferentemente, *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium flavum*, *Brevibacterium lactofermentum* y *Flavobacterium rigense*.

5 Cuando se produce L-arginina mediante el procedimiento de producción de un producto químico, según la presente invención, los microorganismos o las células cultivadas que se pueden utilizar en la producción de L-arginina son, preferentemente, *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium flavum*, *Serratia marcescens*, *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*.

10 Cuando se produce L-alanina mediante el procedimiento de producción de un producto químico, según la presente invención, los microorganismos o las células cultivadas que se pueden utilizar en la producción de L-alanina son, preferentemente, *Brevibacterium flavum* y *Arthrobacter oxydans*.

15 Cuando se produce L-histidina mediante el procedimiento de producción de un producto químico, según la presente invención, los microorganismos o las células cultivadas que se pueden utilizar en la producción de L-histidina son, preferentemente, *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium flavum*, *Brevibacterium ammoniagenes*, *Serratia marcescens*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* y *Streptomyces coelicolor*.

20 Cuando se produce L-prolina mediante el procedimiento de producción de un producto químico, según la presente invención, los microorganismos o las células cultivadas que se pueden utilizar en la producción de L-prolina son, preferentemente, *Corynebacterium glutamicum*, *Kurthia cateniformis*, *Serratia marcescens* y *Escherichia coli*.

25 Cuando se produce L-fenilalanina mediante el procedimiento de producción de un producto químico, según la presente invención, los microorganismos o las células cultivadas que se pueden utilizar en la producción de L-fenilalanina son, preferentemente, *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium flavum*, *Brevibacterium lactofermentum* y *Escherichia coli*.

30 Cuando se produce ácido L-aspartico mediante el procedimiento de producción de un producto químico, según la presente invención, los microorganismos o las células cultivadas que se pueden utilizar en la producción de ácido L-aspartico son, preferentemente, *Brevibacterium flavum*, *Bacillus megatherium*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas fluorescens*.

35 Cuando se produce L-tirosina mediante el procedimiento de producción de un producto químico, según la presente invención, los microorganismos o las células cultivadas que se pueden utilizar en la producción de L-tirosina son, preferentemente, *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium flavum*, *Brevibacterium lactofermentum* y *Escherichia coli*.

40 Cuando se produce metionina mediante el procedimiento de producción de un producto químico, según la presente invención, los microorganismos o las células cultivadas que se pueden utilizar en la producción de metionina son, preferentemente, *Corynebacterium glutamicum*.

45 Cuando se produce serina mediante el procedimiento de producción de un producto químico, según la presente invención, los microorganismos o las células cultivadas que se pueden utilizar en la producción de serina son, preferentemente, *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium flavum*, *Brevibacterium lactofermentum* y *Arthrobacter oxydans*.

50 Cuando se produce valina mediante el procedimiento de producción de un producto químico, según la presente invención, los microorganismos o las células cultivadas que se pueden utilizar en la producción de valina son, preferentemente, *Brevibacterium lactofermentum*, *Serratia marcescens* y *Klebsiella pneumoniae*.

55 Cuando se produce leucina mediante el procedimiento de producción de un producto químico, según la presente invención, los microorganismos o las células cultivadas que se pueden utilizar en la producción de leucina son, preferentemente, *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium lactofermentum* y *Serratia marcescens*.

60 Cuando se produce un aminoácido mediante el procedimiento de producción de un producto químico, según la presente invención, los microorganismos o las células cultivadas que se pueden utilizar en la producción de un aminoácido pueden ser microorganismos o las células cultivadas derivadas de los microorganismos o las células cultivadas de ejemplo aumentando artificialmente su capacidad para producir un aminoácido. Los microorganismos o las células cultivadas que se pueden utilizar en la producción de un aminoácido pueden ser aquellos que tienen propiedades parcialmente modificadas por mutación o recombinación genética. Entre los ejemplos de microorganismos o las células cultivadas que tienen propiedades parcialmente modificadas que se pueden utilizar en la producción de un aminoácido se incluyen *Providencia rettgeri* con mejora en la productividad de L-treonina descrita en el documento JP-A No. 2-219582 y *Corynebacterium glutamicum* con mejora en la productividad de L-alanina descrita en la publicación nacional de solicitud de patente japonesa No. 3-500486.

65 Cuando la fermentación continua se lleva a cabo mediante el procedimiento de producción de un producto químico, según la presente invención, se puede lograr una mayor tasa de producción en volumen con respecto a la fermentación discontinua convencional para permitir una producción de fermentación extremadamente eficiente. La tasa de producción en fermentación continua se calcula utilizando la siguiente ecuación (3):

[Ecuación 3]

5 Tasa de producción de fermentación (g/l/h) = concentración de un producto en licor extraído (g/l) × tasa de extracción de licor de fermentación (l/h) ÷ cantidad de licor corriente del aparato (l) (3)

La tasa de producto de la fermentación en el cultivo discontinuo se determina dividiendo la cantidad (g) de un producto después del consumo de toda la fuente de carbono inicial por el tiempo (h) requerido para el consumo de la fuente de carbono y la cantidad (l) de un cultivo líquido en ese momento.

10 A continuación, se describe el aparato de fermentación continua de la presente invención. El aparato de fermentación continua de la presente invención se puede utilizar en la producción de alcoholes, tales como etanol, 1,3-propanodiol, 1,4-butanodiol y glicerol, ácidos orgánicos, tales como ácido acético, ácido láctico, ácido pirúvico, ácido succínico, ácido málico, ácido itacónico y ácido cítrico, aminoácidos tales como L-treonina, L-lisina, ácido L-glutámico, L-triptófano, L-soleucina, L-glutamina, L-arginina, L-alanina, L-histidina, L-prolina, L-fenilalanina, ácido L-aspartico, L-tirosina, metionina, serina, valina y leucina, ácidos nucleicos tales como inosina y guanosina, compuestos de diamina tales como cadaverina, enzimas, antibióticos y proteínas recombinantes.

20 El aparato de fermentación continua de la presente invención es un aparato para producir un producto químico a través de fermentación continua que incluye filtrar un cultivo de fermentación de un microorganismo o las células cultivadas con una membrana de separación para recuperar un producto a partir de un filtrado y retener simultáneamente un fluido no filtrado en el cultivo de fermentación, o devolverlo por reflujo al mismo, y añadir materiales de fermentación al cultivo de fermentación.

25 El aparato de fermentación continua de la presente invención tiene un tanque de reacción de fermentación para cultivo de fermentación de un microorganismo o las células cultivadas.

30 En una forma, el aparato de fermentación continua de la presente invención incluye un tanque de separación por membrana para filtración del cultivo de fermentación, que está conectado mediante medios de circulación del cultivo de fermentación al tanque de reacción de fermentación y dotado en su interior de una membrana de separación; y medios para regular la diferencia de presión transmembrana de la membrana de separación en el intervalo de 0,1 a 20 kPa, en el que la membrana de separación es una membrana porosa que tiene un tamaño de poro promedio de 0,01 µm o más a menos de 1 µm.

35 En otra forma, el aparato de fermentación continua de la presente invención incluye un elemento de membrana de separación para filtración del cultivo de fermentación, que está dispuesto en el interior del tanque de reacción de fermentación y dotado en su interior de una membrana de separación; medios para descargar un producto de fermentación filtrado, que están conectados al elemento de membrana de separación; y medios para regular la diferencia de presión transmembrana de la membrana de separación en el intervalo de 0,1 a 20 kPa, en el que la membrana de separación es una membrana porosa que tiene un tamaño de poro promedio de 0,01 µm o más a menos de 1 µm.

45 En el aparato de fermentación continua de la presente invención, el coeficiente de permeabilidad al agua purificada de la membrana porosa es, preferentemente, de 2×10^{-9} m³/m²/s/pa o más a 6×10^{-7} m³/m²/s/pa o menos.

En el aparato de fermentación continua de la presente invención, es preferente que el tamaño de poro promedio de la membrana porosa sea de 0,01 µm o más a menos de 0,2 µm, y la desviación estándar del tamaño de poro de la membrana porosa es 0,1 µm o menos.

50 En el aparato de fermentación continua de la presente invención, la membrana porosa es, preferentemente, una membrana porosa que tiene una rugosidad superficial de 0,1 µm o menos.

55 En el aparato de fermentación continua de la presente invención, la membrana porosa es, preferentemente, una membrana porosa que contiene una capa de resina porosa. En el aparato de fermentación continua de la presente invención, la capa de resina porosa es, preferentemente, una capa de resina porosa hecha de un polímero orgánico. En el aparato de fermentación continua de la presente invención, el material de la membrana de polímero orgánico es, más preferentemente, fluoruro de polivinilideno.

60 A continuación, se describe el aparato de fermentación continua utilizado en el procedimiento de producción de un producto químico, según la presente invención, mediante referencia a los dibujos.

65 La figura 1 es una vista lateral esquemática para mostrar un ejemplo del aparato de fermentación continua de tipo de separación por membrana utilizado en el procedimiento de producción de un producto químico, según la presente invención. La figura 1 es un ejemplo típico del aparato en el que un elemento de membrana de separación está dispuesto fuera de un tanque de reacción de fermentación.

En la figura 1, el aparato de fermentación continua de tipo de separación por membrana está compuesto esencialmente de un tanque de reacción de fermentación 1, una capa de separación por membrana 12, y un aparato de regulación de la diferencia de carga hidrostática 3. El elemento de membrana de separación 2 incluye una membrana porosa integrada en él. Este elemento de membrana de separación utiliza preferentemente, por ejemplo, una membrana de separación y un elemento de membrana de separación dados a conocer en la publicación internacional No. 2002/064240. El tanque de separación por membrana 12 está conectado mediante una bomba de circulación de licor de fermentación 11 al tanque de reacción de fermentación 1.

En la figura 1, se introduce un medio mediante una bomba de alimentación de medio 7 en el tanque de reacción de fermentación 1, y si es necesario, el licor de fermentación en el tanque de reacción de fermentación 1 se agita con un agitador 5, y si es necesario, un gas necesario puede ser alimentado mediante un aparato de alimentación de gas 4. En este momento, un gas alimentado se puede recuperar, reciclar y alimentar de nuevo mediante el aparato de alimentación de gas 4. Si es necesario, el pH del licor de fermentación se regula con un sensor/aparato de regulación de pH 9 y una bomba de alimentación de solución reguladora del pH 8 y, si es necesario, la temperatura del licor de fermentación está regulada por un regulador de temperatura 10, con lo que se puede llevar a cabo producción por fermentación altamente productiva. El licor de fermentación en el aparato circula entre el tanque de reacción de fermentación 1 y el tanque de separación por membrana 12 mediante la bomba de circulación de licor de fermentación 11. El licor de fermentación que contiene un producto de fermentación se filtra y se separa mediante el elemento de membrana de separación 2 en microorganismos y un producto de fermentación que se puede extraer, a continuación, del sistema del aparato. Los microorganismos filtrados/separados pueden permanecer en el sistema del aparato alcanzando de este modo una alta densidad de microorganismos en el aparato para lograr la producción por fermentación altamente productiva. La filtración/separación mediante el elemento de membrana de separación 2 se logra mediante una diferencia de presión de carga hidrostática desde la superficie del agua del tanque de separación por membrana 12, no requiriendo, de este modo, una potencia especial. Según sea necesario, la tasa de filtración/separación con el elemento de membrana de separación 2 y la cantidad del licor de fermentación en el aparato se puede controlar apropiadamente mediante el sensor de nivel 6 y el aparato de regulación de la diferencia de presión de carga hidrostática 3. Según sea necesario, un gas necesario puede ser alimentado mediante el aparato de alimentación de gas 4 al interior del tanque de separación por membrana 12. El aire alimentado se puede recuperar, reciclar y alimentar de nuevo mediante el aparato de alimentación de gas 4. La filtración/separación mediante el elemento de membrana de separación 2 también se puede lograr mediante filtración por succión con una bomba o similar o por presurización en el sistema del aparato. Los microorganismos o las células cultivadas pueden cultivarse continuamente en un tanque de cultivo y alimentarse según sea necesario al fermentador. Cultivando los microorganismos o las células cultivadas en un tanque de cultivo y alimentándolos según sea necesario al fermentador, se hace posible la fermentación continua con microorganismos o las células cultivadas siempre frescos que tienen una alta capacidad de producir un producto químico para permitir la fermentación continua con un alto rendimiento productivo durante mucho tiempo.

La figura 2 es una vista lateral esquemática para explicar otro ejemplo del aparato de fermentación continua de tipo de separación por membrana utilizado en la presente invención. Un ejemplo típico del aparato de fermentación continua en el que un elemento de membrana de separación está dispuesto dentro del tanque de reacción de fermentación, utilizado en el procedimiento de producción de un producto químico, según la presente invención, se muestra en la vista esquemática en la figura 2.

En la figura 2, el aparato de fermentación continua de tipo de separación por membrana está compuesto esencialmente de un tanque de reacción de fermentación 1 y un aparato de regulación de la diferencia de carga hidrostática 3. Una membrana porosa está integrada en un elemento de membrana de separación 2 en el tanque de reacción de fermentación 1. Esta membrana porosa puede utilizar, por ejemplo, una membrana de separación y un elemento de membrana de separación dados a conocer en la publicación internacional No. 2002/064240. El elemento de membrana de separación se describirá más adelante con más detalle.

A continuación, se describe en detalle la fermentación continua en el aparato continuo de tipo de separación por membrana en la figura 2.

Se introduce un medio de forma continua o de forma intermitente mediante una bomba de alimentación de medio 7 en el tanque de reacción de fermentación 1. Si es necesario, el medio puede haber sido esterilizado por calentamiento o sometido a esterilización con un filtro antes de la introducción en el tanque de reacción de fermentación. Durante la producción por fermentación, el licor de fermentación en el tanque de reacción de fermentación 1 se agita si es necesario con un agitador 5 en el tanque de reacción de fermentación 1. En el momento de la producción por fermentación, un gas necesario puede ser alimentado si es necesario mediante un aparato de alimentación de gas 4 al tanque de reacción de fermentación 1. En el momento de la producción por fermentación, el pH del licor de fermentación en el tanque de reacción de fermentación 1 se regula si es necesario con un sensor/aparato de regulación de pH 9 y una bomba de alimentación de solución reguladora del pH 8, y la temperatura del licor de fermentación en el tanque de reacción de fermentación 1 se regula si es necesario mediante un regulador de temperatura 10, con lo que se puede llevar a cabo producción por fermentación altamente productiva. En este ejemplo, el pH y la temperatura se ilustran como condiciones fisicoquímicas del licor de

fermentación a regular con aparatos de medición y aparatos de control, pero si es necesario, se puede regular el oxígeno disuelto u ORP, o la concentración de un producto químico en el licor de fermentación se mide con un analizador, tal como un sensor químico en línea, y las condiciones fisicoquímicas se pueden regular utilizando, como indicador, la concentración de un producto químico en el licor de fermentación. En la introducción continua o intermitente del medio, es preferente que la cantidad y la velocidad del medio introducido se regulen apropiadamente utilizando, como indicador, un cierto valor de medición en el entorno físicoquímico del licor de fermentación con el aparato de medición.

En la figura 2, el licor de fermentación se filtra y se separa en microorganismos y un producto de fermentación mediante un elemento de membrana de separación 2 instalado en el tanque de reacción de fermentación 1, y el producto de fermentación se puede sacar del aparato del sistema. Los microorganismos filtrados/separados permanecen en el sistema del aparato alcanzando de este modo una alta densidad de los microorganismos en el sistema del aparato para lograr una producción por fermentación altamente productiva. La filtración/separación con el elemento de membrana de separación 2 se puede lograr mediante una diferencia de presión de carga hidrostática desde la superficie del agua del tanque de reacción de fermentación 1, no requiriendo, de este modo, una potencia especial. Según sea necesario, la tasa de filtración/separación con el elemento de membrana de separación 2 y la cantidad del licor de fermentación en el tanque de reacción de fermentación 1 se puede controlar apropiadamente mediante a sensor de nivel 6 y un aparato de regulación de la diferencia de presión de carga hidrostática 3. La filtración/separación mediante el elemento de membrana de separación también se puede lograr mediante filtración por succión con una bomba o similar o mediante presurización en el sistema del aparato, si es necesario. Los microorganismos o las células cultivadas pueden cultivarse en un tanque de cultivo y alimentarse según sea necesario al fermentador. Cultivando microorganismos o las células cultivadas en un tanque de cultivo y alimentándolos según sea necesario al fermentador, se hace posible la fermentación continua con microorganismos o las células cultivadas siempre frescos que tienen una alta capacidad para producir un producto químico para permitir la fermentación continua con un alto rendimiento productivo mantenido durante mucho tiempo.

A continuación, se describe el elemento de membrana de separación utilizado, preferentemente, en el aparato de fermentación continua utilizado en el procedimiento de producción de un producto químico, según la presente invención.

Se describe el elemento de membrana de separación mostrado en la figura 3. Una membrana de separación y un elemento de membrana de separación dados a conocer en la publicación internacional No. 2002/064240 se pueden utilizar, preferentemente, en el aparato de fermentación continua utilizado en el procedimiento de producción de un producto químico según la presente invención. Tal como se muestra en la figura 3, el elemento de membrana de separación se constituye disponiendo un material de pasaje 14 y la membrana de separación 15 en este orden a ambos lados de una placa de soporte 13 que tiene rigidez. La placa de soporte 13 tiene una parte cóncava 16 a ambos lados de la misma. La membrana de separación 15 filtra el licor de fermentación. Mediante el material de pasaje 14, agua permeada filtrada a través de la membrana de separación 15 se hace fluir eficientemente a la placa de soporte 13. El agua permeada que fluyó hasta la placa de soporte 13 pasa a través de la parte cóncava 16 de la placa de soporte 13 y es descargada mediante una tubería de recogida de agua 17 al exterior del tanque de cultivo de fermentación. La potencia para descargar el agua permeada se puede generar mediante un procedimiento que utiliza una diferencia de presión de carga hidrostática, filtración por succión con una bomba, un líquido, un gas o similar, o presurización en el aparato.

A continuación, se describe el elemento de membrana de separación mostrado en la figura 4. Tal como se muestra en la figura 4, el elemento de membrana de separación está compuesto esencialmente de haces de membrana de separación 18 compuestos de membranas de fibras huecas, una capa de sellado de resina superior 19, y una capa de sellado de resina inferior 20. El haz de membrana de separación está unido y fijado en forma de un haz mediante la capa de sellado de resina superior 19 y la capa de sellado de resina inferior 20. Mediante unión/fijación con la capa de sellado de resina inferior, el hueco de la membrana de fibras huecas se sella para evitar la fuga del cultivo de fermentación. Por otra parte, la capa de sellado de resina superior 19 no sella el orificio interno de la membrana de fibras huecas, para permitir que el agua permeada fluya hasta la tubería de recogida de agua 22. Este elemento de membrana de separación se puede disponer mediante un marco de soporte 21 en el aparato de fermentación continua. El agua permeada filtrada a través del haz de membrana de separación 18 pasa a través del hueco de la membrana de fibras huecas y se descarga mediante la tubería de recogida de agua 22 al exterior del tanque de cultivo de fermentación. La potencia para descargar el agua permeada se puede generar mediante un procedimiento que utiliza una diferencia de presión de carga hidrostática, filtración por succión con una bomba, un líquido, un gas o similar, o presurización en el aparato.

El material que constituye el elemento de membrana de separación del aparato de fermentación continua utilizado en el procedimiento de producción de un producto químico, según la presente invención, es, preferentemente, un miembro resistente a esterilización por vapor a alta presión. Si el interior del aparato de fermentación se puede esterilizar, se puede evitar la contaminación con microorganismos desfavorables durante la fermentación continua, para permitir una fermentación continua más estable. El miembro que constituye el elemento de membrana de separación es, preferentemente, resistente a las condiciones (121 °C, 15 minutos) de esterilización por vapor a alta presión. El material del miembro del elemento de membrana de separación puede seleccionarse apropiadamente

de, por ejemplo, metales, tales como acero inoxidable y aluminio y resinas, tales como resina de poliamida, resina de flúor, resina de policarbonato, resina de poliactal, resina de tereftalato de polibutileno, PVDF, resina de polifenileno éter modificado y resina de polisulfona.

En el aparato de fermentación continua utilizado en el procedimiento de producción de un producto químico, según la presente invención, el elemento de membrana de separación se puede instalar fuera del tanque de fermentación o puede instalarse dentro del tanque de fermentación. En el caso de instalación fuera del tanque de fermentación, el elemento de membrana de separación se puede instalar en un tanque de separación por membrana dispuesto por separado para hacer circular el licor de fermentación entre el tanque de fermentación y el tanque de separación por membrana, durante lo cual el líquido de fermentación se puede filtrar de forma continua a través del elemento de membrana de separación.

En el aparato de fermentación continua utilizado en el procedimiento de producción de un producto químico, según la presente invención, el tanque de separación por membrana es de forma deseable capaz de esterilización por vapor a alta presión. Si el tanque de separación por membrana es capaz de esterilización por vapor a alta presión, la contaminación debida a bacterias saprofitas se puede evitar fácilmente.

Ejemplos

En lo sucesivo, con el fin de explicar la presente invención con más detalle, realizaciones específicas en las cuales el ácido D-láctico, etanol, ácido pirúvico, ácido succínico, 1,3-propanodiol, ácido itacónico, cadaverina, un ácido nucleico y un aminoácido fueron seleccionados como el producto químico, y un microorganismo o las células cultivadas que tienen la capacidad de producir cada producto químico se utilizaron en fermentación continua utilizando los aparatos que se muestran en la vista esquemática en las figuras 1 y 2, se describen con referencia a los ejemplos.

Ejemplo de referencia 1. Preparación de una cepa de levadura que tiene capacidad de producir ácido L-láctico

Se creó una cepa de levadura que tenía capacidad de producir ácido L-láctico de la siguiente manera. Un gen de LDH derivado de ser humano se ligó cadena abajo de un promotor PDC1 en el genoma de levadura, creando de este modo una cepa de levadura que tenía la capacidad de producir ácido L-láctico. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se llevó a cabo utilizando La-Taq (Takara Shuzo Co., Ltd.) o KOD-Plus-polimerasa (TOYOBO CO., LTD.) según las instrucciones adjuntas.

Después de cultivar y recuperar una línea celular establecida de cáncer de mama humano (MCF-7), se extrajo el ARN total utilizando reactivo TRIZOL (Invitrogen). Utilizando el ARN total resultante como plantilla, se llevó a cabo la reacción de transcripción inversa utilizando el sistema de selección SuperScript (Invitrogen), para sintetizar el ADNc. Los detalles de la operación fueron de acuerdo con los protocolos adjuntos. El ADNc obtenido de este modo se utilizó como plantilla de amplificación para la posterior PCR.

Se clonó un gen L-ldh mediante PCR con KOD-Plus-polimerasa y un conjunto de cebadores de oligonucleótidos expuesto en las SEQ ID NOS: 1 y 2, en el que se utilizó el ADNc obtenido por la operación anterior como plantilla de amplificación. Cada fragmento de amplificación por PCR se purificó, a continuación, se fosforiló en su extremo con una polinucleótido quinasa T4 (fabricada por TAKARA) y se ligó al vector pUC118 (que se había tratado mediante escisión con una enzima de restricción HincII y, a continuación, se sometió la superficie de escisión a desfosforilación). Este ligamiento se realizó con el kit de ligamiento de ADN Ver. 2 (fabricado por TAKARA). El producto plasmídico de ligamiento se utilizó para transformar *Escherichia coli* DH5 α a partir del cual se recuperó el ADN plasmídico para dar plásmidos en los que se habían subclonado varios genes L-ldh (SEQ ID NO: 3). Los plásmidos pUC118 resultantes en los que se había insertado el gen L-ldh se digirieron con las enzimas de restricción XhoI y NotI, y cada uno de los fragmentos de ADN resultantes se insertó en un sitio de escisión XhoI/NotI del vector de expresión de levadura pTRS11 (figura 5). De esta manera, se obtuvo el plásmido de expresión del gen L-ldh derivado del ser humano pL-ldh5 (gen L-1dh). El pL-ldh5 mencionado anteriormente, que es un vector de expresión del gen L-ldh derivado del ser humano, se depositó como un plásmido solo como FERM AP-20421 el 21 de febrero de 2005 con el International Patent Organism Depositary (IPOD), National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST) (Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba City, Pref. de Ibaraki, Japón).

Un fragmento de ADN de 1,3 kb que contenía el gen LDH derivado de ser humano y una secuencia de terminación del gen TDH3 derivado de *Saccharomyces cerevisiae* se amplificó por PCR con un conjunto de cebadores de oligonucleótidos expuestos en las SEQ ID NOS: 4 y 5 en las que se utilizó el plásmido pL-ldh5 que contenía el gen LDH derivado de ser humano como plantilla de amplificación. Un fragmento de ADN de 1,2 kb que contenía un gen TRP1 derivado de *Saccharomyces cerevisiae* se amplificó por PCR con un conjunto de cebadores de oligonucleótidos expuestos en las SEQ ID NOS: 6 y 7 y el plásmido pRS424 como plantilla de amplificación. Los fragmentos de ADN respectivos se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % y se purificaron de una manera habitual. Se utilizó una mezcla de los fragmentos de 1,3 kb y 1,2 kb obtenidos de este modo como plantilla de amplificación en la PCR con un conjunto de cebadores de oligonucleótidos expuestos en las SEQ ID NOS: 4 y 7 para dar productos que después se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % para preparar un

fragmento de ADN de 2,5 kb que consistía en el gen LDH derivado de ser humano y el gen TRP1 ligado en él de manera habitual. Este fragmento de ADN de 2,5 kb se transformó de manera habitual en una cepa NBRC10505 de levadura en gemación, convirtiéndola en no auxótrofa para triptófano.

El hecho de que las células transformadas resultantes fueran aquellas células que tenían el gen de la LDH derivado del ser humano ligado a un promotor PDC1 en el genoma de la levadura se confirmó preparando primero el ADN del genoma de la célula transformada de una manera habitual y utilizándolo como plantilla de amplificación en PCR con un conjunto de cebadores de oligonucleótidos expuestos en las SEQ ID NO: 8 y 9 para obtener un fragmento de ADN de amplificación de 0,7 kb. Se confirmó si las células transformadas tenían la capacidad de producir ácido láctico determinando, en HPLC en las siguientes condiciones, la cantidad de ácido láctico contenida en un sobrenadante de cultivo de las células transformadas cultivadas en un medio SC (METHODS IN YEAST GENETICS 2000 EDITION, CSHL PRESS).

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·2 Na 0,1 mM (caudal 0,8 ml/min)
Procedimiento de detección: conductividad eléctrica
Temperatura: 45 °C

La pureza óptica del ácido L-láctico se midió mediante HPLC en las siguientes condiciones.

Columna: TSK-gel Enantio L1 (fabricada por Tosoh Corporation)
Fase móvil: solución acuosa de sulfato de cobre 1 mM
Caudal: 1,0 ml/min
Procedimiento de detección: UV 254 nm
Temperatura: 30 °C

La pureza óptica del ácido L-láctico se calcula utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Pureza óptica (\%)} = 100 \times (L-D) / (L+D)$$

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

Como resultado del análisis por HPLC, se detectaron 4 g/l de ácido L-láctico, y el ácido D-láctico estaba por debajo del límite de detección. A partir del estudio anterior, se confirmó que este transformante tenía capacidad de producir ácido L-láctico. Las células transformadas resultantes se utilizaron como la cepa SW-1 de levadura en los ejemplos a continuación.

Ejemplo de referencia 2. Preparación de una membrana porosa (No. 1)

Una resina de fluoruro de polivinilideno (PVDF) y N,N-dimetilacetamida se utilizaron como una resina y un disolvente, respectivamente, y se agitaron suficientemente a una temperatura de 90 °C para dar una solución madre que tenía la siguiente composición:

Fluoruro de polivinilideno: 13,0 % en peso, y
N,N-dimetilacetamida: 87,0 % en peso

A continuación, la solución madre se enfrió a una temperatura de 25 °C, a continuación se aplicó sobre una tela no tejida de fibra de poliéster que tenía una densidad de 0,48 g/cm³ y un grosor de 220 µm unida previamente a una placa de vidrio, y se sumergió inmediatamente durante 5 minutos en un baño de coagulación a una temperatura de 25 °C que tenía la siguiente composición, para dar un material de base poroso que tenía una capa de resina porosa formada sobre él.

Agua: 30,0 % en peso
N,N-Dimetilacetamida: 70,0 % en peso

Este material de base poroso se desprendió de la placa de vidrio, se sumergió 3 veces en agua caliente a una temperatura de 80 °C, siendo lavado de este modo para eliminar N,N-dimetilacetamida, para dar una membrana de separación.

La superficie de la capa de resina porosa, en un área de 9,2 µm×10,4 µm, se observó a un aumento de 10.000 veces bajo un microscopio electrónico de barrido. El diámetro promedio de todos los poros observables fue 0,1 µm.

A continuación, la membrana de separación se evaluó para su coeficiente de permeabilidad al agua purificada. La medición del coeficiente de permeabilidad al agua purificada se llevó a cabo con agua purificada tratada con

membrana de ósmosis inversa a 25 °C con una altura de carga hidrostática de 1 m.

La desviación estándar del tamaño de poro promedio fue 0,035 µm y la rugosidad superficial de la membrana fue 0,06 µm. La membrana porosa preparada de este modo podría utilizarse, preferentemente, en la presente invención.

Ejemplo de referencia 3. Preparación de una membrana porosa (No. 2)

Una resina de fluoruro de polivinilideno (PVDF) se utilizó como resina, polietilenglicol (PEG) que tenía un peso molecular de aproximadamente 20.000 como un agente formador de poros, N,N-dimetilacetamida como disolvente, y agua purificada como disolvente, y estos materiales se agitaron suficientemente a una temperatura de 90 °C para dar una solución madre que tenía la siguiente composición:

Fluoruro de polivinilideno: 13,0 % en peso
 Polietilenglicol: 5,5 % en peso
 N,N-Dimetilacetamida: 78,0 % en peso, y
 Agua purificada: 3,5 % en peso.

A continuación, la solución madre se enfrió a una temperatura de 25 °C, a continuación se aplicó sobre una tela no tejida de fibra de poliéster que tenía una densidad de 0,48 g/cm³ y un grosor de 220 µm, se sumergió inmediatamente durante 5 minutos en agua purificada a 25 °C, se sumergió 3 veces en agua caliente a 80 °C, siendo lavada de este modo para eliminar N,N-dimetilacetamida y polietilenglicol para dar una membrana de separación.

La superficie de la capa de resina porosa en un área de 9,2 µm×10,4 µm en el lado de la membrana de separación a la que se había aplicado la solución madre se observó a un aumento de 10.000 veces bajo un microscopio electrónico de barrido. El diámetro promedio de todos los poros observables fue 0,02 µm.

La membrana de separación se evaluó para su coeficiente de permeabilidad al agua purificada. El coeficiente de permeabilidad al agua purificada fue 2×10^{-9} m³/m²·s·Pa. La medición del coeficiente de permeabilidad al agua purificada se llevó a cabo con agua purificada tratada con membrana de ósmosis inversa a 25 °C con una altura de carga hidrostática de 1 m.

La desviación estándar del tamaño de poro promedio fue 0,0055 µm y la rugosidad superficial de la membrana fue 0,1 µm. La membrana porosa preparada de este modo podría utilizarse, preferentemente, en la presente invención.

Ejemplo de referencia 4. Preparación de una membrana porosa (No. 3)

Se obtuvo una membrana de separación de la misma manera que en el ejemplo de referencia 3 excepto en que se utilizó una solución madre que tenía la siguiente composición.

Fluoruro de polivinilideno: 13,0 % en peso
 Polietilenglicol: 5,5 % en peso
 N,N-Dimetilacetamida: 81,5 % en peso.

La superficie de la capa de resina porosa en un área de 9,2 µm×10,4 µm en el lado de la membrana de separación a la que se había aplicado la solución madre se observó a un aumento de 10.000 veces bajo un microscopio electrónico de barrido. El diámetro promedio de todos los poros observables fue 0,19 µm.

El coeficiente de permeabilidad al agua purificada evaluado de esta membrana de separación fue 100×10^{-9} m³/m²·s·Pa. La medición del coeficiente de permeabilidad al agua purificada se llevó a cabo con agua purificada tratada con membrana de ósmosis inversa a 25 °C con una altura de carga hidrostática de 1 m.

La desviación estándar del tamaño de poro promedio fue 0,060 µm y la rugosidad superficial de la membrana fue 0,08 µm. La membrana porosa preparada de este modo podría utilizarse, preferentemente, en la presente invención.

Ejemplo de referencia 5. Preparación de una membrana porosa (No. 4)

Una resina de fluoruro de polivinilideno (PVDF) y N,N-dimetilacetamida se utilizaron como resina y disolvente, respectivamente, y se agitaron suficientemente a una temperatura de 90 °C para dar una solución madre que tiene la siguiente composición:

Fluoruro de polivinilideno: 15,0 % en peso, y
 N,N-Dimetilacetamida: 85,0 % en peso

A continuación, la solución madre se enfrió a una temperatura de 25 °C, a continuación se aplicó sobre una tela no

tejida de fibra de poliéster que tenía una densidad de 0,48 g/cm³ y un grosor de 220 µm unida previamente a una placa de vidrio, y se sumergió inmediatamente durante 5 minutos en un baño de coagulación a una temperatura de 25 °C que tiene la siguiente composición, para dar un material de base poroso que tenía una capa de resina porosa formada sobre él.

Agua: 100,0 % en peso

Este material de base poroso se desprendió de la placa de vidrio, se sumergió 3 veces en agua caliente a una temperatura de 80 °C, siendo lavado de este modo para eliminar N,N-dimetilacetamida, para dar una membrana de separación. La superficie de la capa de resina porosa, en un área de 9,2 µm×10,4 µm, se observó a un aumento de 10.000 veces bajo un microscopio electrónico de barrido. El diámetro promedio de todos los poros observables fue 0,008 µm. El coeficiente de permeabilidad al agua purificada evaluado de esta membrana de separación fue 0,3×10⁻⁹ m³/m²·s·Pa. La medición del coeficiente de permeabilidad al agua purificada se llevó a cabo con agua purificada tratada con membrana de ósmosis inversa a 25 °C con una altura de carga hidrostática de 1 m. La desviación estándar del tamaño de poro promedio fue 0,002 µm y la rugosidad superficial de la membrana fue 0,06 µm.

Ejemplo 1. Producción de ácido L-láctico mediante fermentación continua utilizando levadura (No. 1)

La producción de ácido L-láctico se llevó a cabo utilizando el aparato de fermentación continua de tipo de separación por membrana en la figura 1 y un medio de fermentación de ácido láctico con levadura que tenía la composición mostrada en la tabla 1. El medio se utilizó después de esterilización por vapor a alta presión (121 °C, 15 minutos). Como el material del elemento de membrana de separación, se utilizó un moldeo de acero inoxidable y resina de polisulfona. Como la membrana de separación, se utilizó la membrana porosa preparada en el ejemplo de referencia 2. A menos que se indique lo contrario, las condiciones operativas en el ejemplo 1 son las siguientes:

Capacidad del tanque de reacción: 2 (l)

Capacidad del tanque de separación por membrana: 0,5 (l)

Membrana de separación utilizada: membrana de filtración de fluoruro de polivinilideno

Área de filtración eficaz del elemento de separación por membrana: 60 cm²

Control de la temperatura: 30 (°C)

Aireación del tanque de reacción: 0,05 (l/min)

Aireación del tanque de separación por membrana: 0,3 (l/min)

Velocidad de agitación del tanque de reacción: 100 (rpm)

Ajuste del pH: ajustado a pH 5 con NaOH 1 N

Velocidad de alimentación de medio de fermentación de ácido láctico: control variable en el intervalo de 50 a 300 ml/h.

Cantidad de líquido circulante con un aparato de circulación de líquido de fermentación: 0,1 (l/min)

Regulación de la cantidad de agua de permeación de la membrana: regulación del caudal mediante diferencia de presión transmembrana (Desde el inicio de la fermentación continua hasta 100 horas: regulado a de 0,1 kPa o más a 5 kPa o menos,

de 100 horas a 200 horas: regulado a de 0,1 kPa o más a 2 kPa o menos, y

de 200 horas a 300 horas: regulado a de 0,1 kPa o más a 20 kPa o menos)

La levadura SW-1 creada en el ejemplo de referencia 1 se utilizó como el microorganismo, un medio de fermentación de ácido láctico que tenía la composición mostrada en la tabla 1 se utilizó como el medio, la concentración de ácido láctico como un producto se evaluó mediante HPLC mostrada en el ejemplo de referencia 1, y la concentración de glucosa se midió con el ensayo Glucose Test Wako C (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.).

[Tabla 1]

Medio de fermentación de ácido láctico con levadura

Glucosa	100 g
Base nitrogenada de levadura sin aminoácidos (Difco)	6,7 g
19 aminoácidos estándar excluyendo leucina	152 mg
Leucina	760 mg
Inositol	152 mg
Ácido p-aminobenzoico	16 mg
Adenina	40 mg
Uracilo	152 mg

Unidad (1/litro)

En primer lugar, la cepa SW-1 se cultivó con agitación durante una noche en 5 ml de un medio de fermentación de ácido láctico en un tubo de ensayo (antes del precultivo preliminar). El cultivo resultante se inoculó en 100 ml de un

medio fresco de fermentación de ácido láctico y se cultivó con agitación durante 24 horas a 30 °C en un matraz Sakaguchi de 500 ml (precultivo preliminar). El precultivo preliminar se inoculó en 1,5 l de un medio de fermentación de ácido láctico en el aparato de fermentación continua de tipo de separación por membrana mostrado en la figura 1, un tanque de reacción 1 se agitó con un agitador 5 unido a él, seguido por la regulación de la aireación, el control de la temperatura y el ajuste del pH del tanque de reacción 1, y sin hacer funcionar una bomba de circulación de licor de fermentación 10, el microorganismo se cultivó durante 24 horas (precultivo). Inmediatamente después de que terminó el precultivo, se hizo funcionar la bomba de circulación de licor de fermentación 10, y el microorganismo se cultivó de forma continua en las condiciones en las que, además de las condiciones operativas en el momento del precultivo, se aireó un tanque de separación por membrana 2, se alimentó de forma continua un medio de fermentación de ácido láctico, y la cantidad de agua de permeación de la membrana se reguló de modo que la cantidad del licor de fermentación en el aparato de fermentación continua de tipo de separación por membrana se convirtió en 2 l, con lo que se produjo ácido L-láctico mediante fermentación continua. En este ensayo de fermentación continua, la cantidad de agua de permeación de la membrana se reguló y se cambió en las condiciones de control del agua de permeación de la membrana descritas anteriormente, durante lo cual la diferencia de carga hidrostática se midió como diferencia de presión transmembrana con un aparato de regulación de la diferencia de carga hidrostática 3. La concentración de ácido L-láctico producido en el licor de fermentación de permeación de la membrana y la concentración de glucosa residual se midieron en un momento apropiado.

Los resultados en el ensayo de fermentación continua durante 300 horas se muestran en la tabla 2. La producción de ácido L-láctico mediante fermentación continua estable fue viable mediante el procedimiento de producción de un producto químico, según la presente invención, utilizando el aparato de fermentación continua de tipo de separación por membrana en la figura 1. La diferencia de presión transmembrana fluctuaba dentro de 2 kPa en el periodo completo de fermentación continua.

Ejemplo 2. Producción de ácido L-láctico mediante fermentación continua utilizando levadura (No. 2)

Se llevó a cabo el mismo ensayo de fermentación continua de ácido L-láctico que en el ejemplo 1 utilizando la membrana porosa en el ejemplo de referencia 3 como una membrana de separación. Los resultados se muestran en la tabla 2. Como resultado, la producción estable de ácido L-láctico mediante fermentación continua fue viable. La diferencia de presión transmembrana fluctuaba dentro de 2 kPa en el periodo completo de fermentación continua.

Ejemplo 3. Producción de ácido L-láctico mediante fermentación continua utilizando levadura (No. 3)

Se llevó a cabo el mismo ensayo de fermentación continua de ácido L-láctico que en el ejemplo 1 utilizando la membrana porosa en el ejemplo de referencia 4 como una membrana de separación. Los resultados se muestran en la tabla 2. Como resultado, la producción estable de ácido L-láctico mediante fermentación continua fue viable. La diferencia de presión transmembrana fluctuaba dentro de 2 kPa en el periodo completo de fermentación continua.

Ejemplo 4. Producción de ácido L-láctico mediante fermentación continua utilizando levadura (No. 4)

La producción de ácido L-láctico se llevó a cabo utilizando el aparato de fermentación continua en la figura 2 y un medio de fermentación con levadura que tenía la composición mostrada en la tabla 1. El medio se utilizó después de esterilización por vapor a alta presión (121 °C, 15 minutos). Como el material del elemento de membrana de separación, se utilizó un moldeo de acero inoxidable y resina de polisulfona. Como la membrana de separación, se utilizó la membrana porosa preparada en el ejemplo de referencia 1. A menos que se indique lo contrario, las condiciones operativas en este ejemplo son las siguientes:

Capacidad del tanque de reacción: 2 (l)

Membrana de separación utilizada: membrana de filtración de fluoruro de polivinilideno

Área de filtración eficaz del elemento de separación por membrana: 120 cm²

Control de la temperatura: 30 (°C)

Aireación del tanque de reacción de fermentación: 0,05 (l/min)

Velocidad de alimentación de medio de fermentación de ácido láctico: control variable en el intervalo de 50 a 300 ml/h.

Velocidad de agitación del tanque de reacción de fermentación: 800 (rpm)

Ajuste del pH: ajustado a pH 5 con NaOH 1 N

Regulación de la cantidad de agua de permeación de la membrana: regulación del caudal mediante diferencia de presión transmembrana

(Desde el inicio de la fermentación continua hasta 80 horas: regulado a de 0,1 kPa o más a 5 kPa o menos,

de 80 horas a 160 horas: regulado a de 0,1 kPa o más a 2 kPa o menos, y

de 160 horas a 240 horas: regulado a de 0,1 kPa o más a 20 kPa o menos)

Esterilización: el tanque de cultivo que incluía el elemento de membrana de separación, y el medio utilizado, se esterilizaron con vapor a alta presión en un autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

La cepa SW-1 de levadura creada en el ejemplo de referencia 1 se utilizó como el microorganismo, un medio de fermentación de ácido láctico que tenía la composición mostrada en la tabla 1 se utilizó como el medio, la

concentración de ácido L-láctico como un producto se evaluó mediante HPLC mostrada en el ejemplo de referencia 1, y la concentración de glucosa se midió con el ensayo Glucose Test Wako C (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.).

- 5 En primer lugar, la cepa SW-1 se cultivó con agitación durante una noche en 5 ml de un medio de fermentación de ácido láctico en un tubo de ensayo (antes del precultivo preliminar). El cultivo resultante se inoculó en 100 ml de un medio fresco de fermentación de ácido láctico y se cultivó con agitación durante 24 horas a 30 °C en un matraz Sakaguchi de 500 ml (precultivo preliminar). El precultivo preliminar se inoculó en 1,5 l de un medio de fermentación de ácido láctico en el aparato de fermentación continua de tipo de separación por membrana mostrado en la figura 2,
- 10 un tanque de reacción 1 se agitó a 400 rpm con un agitador 5 unido a él, seguido por la regulación de la aireación, el control de la temperatura y el ajuste del pH del tanque de reacción 1, y el microorganismo se cultivó durante 24 horas (precultivo). Inmediatamente después de que terminó el precultivo, el microorganismo se cultivó de forma continua con un medio de fermentación de ácido láctico alimentado de forma continua y con la cantidad de agua de permeación de la membrana regulada de modo que la cantidad del licor de fermentación en el aparato de
- 15 fermentación continua de tipo de separación por membrana se convirtió en 1,5 l, con lo que se produjo ácido L-láctico mediante fermentación continua. En este ensayo de fermentación continua, la cantidad de agua de permeación de la membrana se reguló y se cambió en las condiciones de control del agua de permeación de la membrana descritas anteriormente, durante lo cual la diferencia de carga hidrostática se midió como diferencia de presión transmembrana con un aparato de regulación de la diferencia de carga hidrostática 3. La concentración de
- 20 ácido L-láctico producido en el licor de fermentación de permeación de la membrana y la concentración de glucosa residual se midieron en un momento apropiado. El rendimiento de ácido L-láctico a azúcar y la tasa de producción de ácido L-láctico calculadas a partir del ácido L-láctico y la glucosa introducida calculada a partir de la concentración de glucosa se muestran en la tabla 2.
- 25 Como resultado del ensayo de fermentación durante 240 horas, la producción estable de ácido L-láctico mediante fermentación continua fue viable mediante el procedimiento de producción de un producto químico, según la presente invención, utilizando el aparato de fermentación continua en la figura 2. La diferencia de presión transmembrana fluctuaba dentro de 2 kPa en el periodo completo de fermentación continua.

30 Ejemplo 5. Producción de ácido L-láctico mediante fermentación continua utilizando levadura (No. 5)

- Se llevó a cabo el mismo ensayo de fermentación continua de ácido L-láctico que en el ejemplo 4 utilizando la membrana porosa preparada en el ejemplo de referencia 3 como una membrana de separación. Los resultados se muestran en la tabla 2. Como resultado, la producción estable de ácido L-láctico fue viable mediante fermentación
- 35 continua. La diferencia de presión transmembrana fluctuaba dentro de 2 kPa en el periodo completo de fermentación continua.

Ejemplo 6. Producción de ácido L-láctico mediante fermentación continua utilizando levadura (No. 6)

- 40 El mismo ensayo de fermentación continua de ácido L-láctico que en el ejemplo 5 se llevó a cabo utilizando la membrana porosa preparada en el ejemplo de referencia 4 como una membrana de separación. Los resultados se muestran en la tabla 2. Como resultado, la producción estable de ácido L-láctico fue viable mediante fermentación continua. La diferencia de presión transmembrana fluctuaba dentro de 2 kPa en el periodo completo de fermentación continua.

45 Ejemplo comparativo 1. Producción de ácido L-láctico mediante fermentación discontinua

- Como una forma de fermentación utilizando un microorganismo, se llevó a cabo la fermentación discontinua más típica para evaluar su productividad de ácido L-láctico. Se llevó a cabo un ensayo de fermentación discontinua en el
- 50 que se utilizó el medio de fermentación de ácido láctico mostrado en la tabla 1 y se utilizó el tanque de reacción 1 solamente del aparato de fermentación continua de tipo de separación por membrana en la figura 1. El medio se utilizó después de esterilización por vapor a alta presión (121 °C, 15 minutos). La cepa SW-1 de levadura creada en el ejemplo de referencia 1 también se utilizó como el microorganismo en este ejemplo comparativo, la concentración de ácido L-láctico como un producto se evaluó mediante HPLC mostrada en el ejemplo de referencia 1, y la
- 55 concentración de glucosa se midió con el ensayo Glucose Test Wako C (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). Las condiciones operativas en el ejemplo comparativo 2 son las siguientes:

Capacidad del tanque de reacción (cantidad del medio de fermentación de ácido láctico): 1 (l)

Control de la temperatura: 30 (°C)

- 60 Aireación del tanque de reacción: 0,05 (l/min)

Velocidad de agitación del tanque de reacción: 100 (rpm)

Ajuste del pH: ajustado a pH 5 con NaOH 1 N

- En primer lugar, la cepa SW-1 se cultivó con agitación durante una noche en 5 ml de un medio de fermentación de
- 65 ácido láctico en un tubo de ensayo (precultivo preliminar). El precultivo preliminar se inoculó en 100 ml de un medio fresco de fermentación de ácido láctico y se cultivó con agitación durante 24 horas en un matraz Sakaguchi de 500

ml (precultivo). El precultivo se inoculó en 1,5 l de un medio de fermentación de ácido láctico en el aparato de fermentación continua de tipo de separación por membrana, un tanque de reacción 1 se agitó a 100 rpm con un agitador 5 unido a él, y el tanque de reacción 1 se aireó. Se llevaron a cabo el ajuste de la temperatura y el ajuste del pH, y sin hacer funcionar una bomba de circulación de licor de fermentación 10, se llevó a cabo el cultivo de fermentación discontinua. La cantidad del microorganismos que creció en este cultivo fue 14 en términos de absorbancia a 600 nm. Los resultados de la fermentación discontinua se muestran en la tabla 2.

[Tabla 2]

	Ejemplo comparativo 1	Ejemplo 1	Ejemplo 2	Ejemplo 3	Ejemplo 4	Ejemplo 5	Ejemplo 6
Tiempo de fermentación (h)	72	300	300	300	300	300	300
Glucosa introducida total (g)	100	2.620	2.720	2.750	2.120	2.070	2.110
Ácido L-láctico producido total (g)	26	1.580	1.525	1.540	1.350	1.305	1.350
Glucosa no utilizada (g)	0	60	75	90	40	30	35
Rendimiento de ácido L-láctico respecto a azúcar (g/g)	0,26	0,62	0,58	0,58	0,65	0,64	0,65
Tasa de producción de ácido L-láctico (g/l/h)	0,36	2,6	2,5	2,5	3,0	2,9	3,0

La tasa de producción de ácido L-láctico mejoró significativamente mediante el procedimiento de producción de un producto químico, según la presente invención, utilizando el aparato de fermentación mostrado en las figuras 1 y 2.

Ejemplo comparativo 2. Producción de ácido L-láctico mediante fermentación continua utilizando levadura

Se llevó a cabo fermentación continua de la misma manera que en el ejemplo 1 excepto en que la membrana porosa que tenía un diámetro de poro pequeño y un coeficiente de permeabilidad al agua purificada bajo, preparada en el ejemplo de referencia 5, se utilizó como la membrana de separación, y la cantidad de agua que penetró a través de la membrana se reguló regulando el caudal con la diferencia de presión transmembrana (regulada en el intervalo de 0,1 o más a 20 kPa o menos en el periodo completo de fermentación continua).

Como resultado, la diferencia de presión transmembrana superó los 20 kPa en 96 horas después de que se inició el cultivo, para causar obstrucción de la membrana, y, por lo tanto, la fermentación continua se detuvo. Por consiguiente, se reveló que la membrana porosa preparada en el ejemplo de referencia 5 no es adecuada para la producción de ácido L-láctico.

Ejemplo comparativo 3. Producción de ácido L-láctico mediante fermentación continua utilizando levadura. Se llevó a cabo fermentación continua de la misma manera que en el ejemplo 4 excepto en que la membrana porosa que tenía un diámetro de poro pequeño y un coeficiente de permeabilidad al agua purificada bajo, preparada en el ejemplo de referencia 5, se utilizó como la membrana de separación, y la cantidad de agua que penetró a través de la membrana se reguló regulando el caudal con la diferencia de presión transmembrana (regulada en el intervalo de 0,1 o más a 20 kPa o menos en el periodo completo de fermentación continua).

Como resultado, la diferencia de presión transmembrana superó los 20 kPa en 80 horas después de que se inició el cultivo, para causar obstrucción de la membrana, y, por lo tanto, la fermentación continua se detuvo. Por consiguiente, se reveló que la membrana porosa preparada en el ejemplo de referencia 5 no es adecuada para la producción de ácido L-láctico.

Ejemplo 7. Producción de etanol mediante fermentación continua (No. 1)

Se llevó a cabo la producción de etanol utilizando el aparato de fermentación continua de tipo de separación por membrana en la figura 1 y un medio de fermentación de etanol que tenía la composición mostrada en la tabla 3. El medio se utilizó después de esterilización por vapor a alta presión (121 °C, 15 minutos). Como la membrana de separación, se utilizó la membrana porosa preparada en el ejemplo de referencia 2. A menos que se indique lo contrario, las condiciones operativas en este ejemplo son las siguientes:

Capacidad del tanque de reacción: 2 (l)

Capacidad del tanque de separación por membrana: 0,5 (l)

Membrana de separación utilizada: membrana de filtración de fluoruro de polivinilideno

Área de filtración eficaz del elemento de separación por membrana: 120 cm²

Control de la temperatura: 30 (°C)

Aireación del tanque de reacción: 0,05 (l/min)

Aireación del tanque de separación por membrana: 0,3 (l/min)

Velocidad de agitación del tanque de reacción: 100 (rpm)

Ajuste del pH: ajustado a pH 5 con NaOH 1 N

Velocidad de alimentación del medio de fermentación de etanol: control variable en el intervalo de 50 a 300 ml/h.

Cantidad de líquido circulante con un aparato de circulación de licor de fermentación: 0,1 (l/min)

Regulación de la cantidad de agua de permeación de la membrana: regulación del caudal mediante diferencia de presión transmembrana

(Desde el inicio de la fermentación continua hasta 100 horas: regulado a de 0,1 kPa o más a 5 kPa o menos, de 100 horas a 200 horas: regulado a de 0,1 kPa o más a 2 kPa o menos, y de 200 horas a 300 horas: regulado a de 0,1 kPa o más a 20 kPa o menos)

La cepa NBRC10505 se utilizó como el microorganismo, un medio de fermentación de etanol que tenía la composición mostrada en la tabla 1 se utilizó como el medio, la concentración de etanol como un producto se cuantificó mediante cromatografía de gases para evaluación. En la cromatografía de gases, se utilizó una columna Shimadzu GC-2010 capilar GC TC-1 (GL Science) de 15 metros de L x 0,53 mm de DI, fd 1,5 μ m, y se utilizó un detector por ionización de llama de hidrógeno (FID) en la detección y el cálculo. La concentración de glucosa se midió con el ensayo Glucose Test Wako C (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.).

[Tabla 3]

Medio de fermentación de etanol

Glucosa	100 g
Base nitrogenada de levadura sin aminoácidos (Difco)	6,7 g
19 aminoácidos estándar excluyendo leucina	78 mg
Leucina	380 mg
Inositol	76 mg
Ácido p-aminobenzoico	8 mg
Adenina	40 mg
Uracilo	76 mg
Unidad (1/litro)	

En primer lugar, la cepa NBRC10505 se cultivó con agitación durante una noche en 5 ml de un medio de fermentación de etanol en un tubo de ensayo (antes del precultivo preliminar). El cultivo resultante se inoculó en 100 ml de un medio fresco de fermentación de etanol y se cultivó con agitación durante 24 horas a 30 °C en un matraz Sakaguchi de 500 ml (precultivo preliminar). El precultivo preliminar se inoculó en 1,5 l de un medio de fermentación de etanol en el aparato de fermentación continua de tipo de separación por membrana mostrados en la figura 1, un tanque de reacción 1 se agitó a 100 rpm con un agitador 5 unido a él, seguido por la regulación de la aireación, el control de la temperatura y el ajuste del pH del tanque de reacción 1, y sin hacer funcionar una bomba de circulación de licor de fermentación 10, el microorganismo se cultivó durante 24 horas (precultivo). Inmediatamente después de que terminó el precultivo, se hizo funcionar la bomba de circulación de licor de fermentación 10, y el microorganismo se cultivó de forma continua en las condiciones en las que, además de las condiciones operativas en el momento del precultivo, se aireó un tanque de separación por membrana 2, un medio de fermentación de etanol se alimentó de forma continua, y la cantidad de agua de permeación de la membrana se reguló de modo que la cantidad del licor de fermentación en el aparato de fermentación continua de tipo de separación por membrana se convirtió en 2 l, con lo que se produjo etanol mediante fermentación continua. En este ensayo de fermentación continua, la cantidad de agua de permeación de la membrana se reguló y se cambió en las condiciones de control del agua que permea la membrana descritas anteriormente, durante lo cual la diferencia de carga hidrostática se midió como diferencia de presión transmembrana con un aparato de regulación de la diferencia de carga hidrostática 3. La concentración de etanol producido en el licor de fermentación de permeación de la membrana y la concentración de glucosa residual se midieron en un momento apropiado. Los resultados se muestran en la tabla 4.

La producción estable de etanol mediante fermentación continua de tipo separación por membrana fue viable mediante el procedimiento de producción de un producto químico, según la presente invención, utilizando el aparato de fermentación continua en la figura 1. La diferencia de presión transmembrana fluctuaba dentro de 2 kPa en el periodo completo de fermentación continua.

Ejemplo 8. Producción de etanol mediante fermentación continua (No. 2)

La producción de etanol se llevó a cabo utilizando el aparato de fermentación continua en la figura 2 y un medio de fermentación de etanol que tenía la composición mostrada en la tabla 3. El medio se utilizó después de esterilización por vapor a alta presión (121 °C, 15 minutos). Como el material del elemento de membrana de separación, se utilizó un moldeo de acero inoxidable y resina de polisulfona. Como la membrana de separación, se utilizó la membrana porosa preparada en el ejemplo de referencia 2. A menos que se indique lo contrario, las condiciones operativas en este ejemplo son las siguientes:

Capacidad del tanque de reacción: 2 (l)

Membrana de separación utilizada: membrana de filtración de fluoruro de polivinilideno

Área de filtración eficaz del elemento de separación por membrana: 120 cm²

Control de la temperatura: 30 (°C)

5 Aireación del tanque de reacción de fermentación: 0,05 (l/min)

Velocidad de alimentación de medio de fermentación de ácido láctico: control variable en el intervalo de 50 a 300 ml/h.

Velocidad de agitación del tanque de reacción de fermentación: 800 (rpm)

Ajuste del pH: ajustado a pH 5 con NaOH 1 N

10 Regulación de la cantidad de agua de permeación de la membrana: regulación del caudal mediante diferencia de presión transmembrana

(Desde el inicio de la fermentación continua hasta 80 horas: regulado a de 0,1 kPa o más a 5 kPa o menos,

de 80 horas a 160 horas: regulado a de 0,1 kPa o más a 2 kPa o menos, y

de 160 horas a 240 horas: regulado a de 0,1 kPa o más a 20 kPa o menos)

15 Esterilización: el tanque de cultivo que incluía el elemento de membrana de separación, y el medio utilizado, se esterilizaron con vapor a alta presión en un autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

20 La cepa NBRC10505 de levadura se utilizó como el microorganismo, un medio de fermentación de etanol que tenía la composición mostrada en la tabla 2 se utilizó como el medio, la concentración de etanol como un producto se evaluó mediante cromatografía de gases mostrada en el ejemplo 7, y la concentración de glucosa se midió con el ensayo Glucose Test Wako C (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.).

25 En primer lugar, la cepa NBRC10505 se cultivó con agitación durante una noche en 5 ml de un medio de fermentación de etanol en un tubo de ensayo (antes del precultivo preliminar). El cultivo resultante se inoculó en 100 ml de un medio fresco de fermentación de etanol y se cultivó con agitación durante 24 horas a 30 °C en un matraz Sakaguchi de 500 ml (precultivo preliminar). El precultivo preliminar se inoculó en 1,5 l de un medio de fermentación de etanol en el aparato de fermentación continua de tipo de separación por membrana mostrado en la figura 2, un tanque de reacción 1 se agitó a 400 rpm con un agitador 5 unido a él, seguido por la regulación de la aireación, el control de la temperatura y el ajuste del pH del tanque de reacción 1, y el microorganismo se cultivó durante 24 horas (precultivo). Inmediatamente después de que terminó el precultivo, el microorganismo se cultivó de forma continua en un medio de fermentación de etanol alimentado de forma continua con la cantidad de agua de permeación de la membrana regulada de modo que la cantidad del licor de fermentación en el aparato de fermentación continua de tipo de separación por membrana se convirtió en 1,5 l, con lo que se produjo etanol

30 mediante fermentación continua. En este ensayo de fermentación continua, la cantidad de agua de permeación de la membrana se reguló y se cambió en las condiciones de control del agua de permeación de la membrana descritas anteriormente, durante lo cual la diferencia de carga hidrostática se midió como diferencia de presión transmembrana con un aparato de regulación de la diferencia de carga hidrostática 3. La concentración de etanol producido en el licor de fermentación de permeación de la membrana y la concentración de glucosa residual se

35 midieron en un momento apropiado. El rendimiento de etanol respecto a azúcar y la tasa de producción de etanol calculado a partir del etanol y la glucosa introducida calculada a partir de la concentración de glucosa se muestran en la tabla 4.

45 La producción estable de etanol mediante fermentación continua fue viable mediante el procedimiento de producción de un producto químico, según la presente invención, utilizando el aparato de fermentación continua en la figura 2. La diferencia de presión transmembrana fluctuaba dentro de 2 kPa en el periodo completo de fermentación continua.

Ejemplo comparativo 4. Producción de etanol mediante fermentación discontinua

50 Como una forma de fermentación utilizando un microorganismo, se llevó a cabo la fermentación discontinua más típica para evaluar su productividad de etanol. Se llevó a cabo un ensayo de fermentación discontinua en la que se utilizó el medio de fermentación de mostrado en la tabla 3 y se utilizó solo el tanque de reacción 1 del aparato de fermentación continua de tipo de separación por membrana en la figura 1. El medio se utilizó después de esterilización por vapor a alta presión (121 °C, 15 minutos). La cepa NBRC10505 también se utilizó como el

55 microorganismo en este ejemplo comparativo, la concentración de etanol como un producto se evaluó mediante cromatografía de gases mostrada en el ejemplo 6, y la concentración de glucosa se midió con el ensayo Glucose Test Wako C (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). Las condiciones operativas en este ejemplo comparativo son las siguientes:

60 Capacidad del tanque de reacción (cantidad del medio de fermentación de etanol): 1 (l)

Control de la temperatura: 30 (°C)

Aireación del tanque de reacción: 0,05 (l/min)

Velocidad de agitación del tanque de reacción: 100 (rpm)

Ajuste del pH: ajustado a pH 5 con NaOH 1 N

65 En primer lugar, la cepa NBRC10505 se cultivó con agitación durante una noche en 5 ml de un medio de

fermentación de etanol en un tubo de ensayo (precultivo preliminar). El precultivo preliminar se inoculó en 100 ml de un medio fresco de fermentación de etanol y se cultivó con agitación durante 24 horas en un matraz Sakaguchi de 500 ml (precultivo). El precultivo se inoculó en 1,5 l de un medio de fermentación de etanol en el aparato de fermentación continua de tipo de separación por membrana, un tanque de reacción 1 se agitó a 100 rpm con un agitador 5 unido a él, y el tanque de reacción 1 se aireó. Se llevaron a cabo el ajuste de la temperatura y el ajuste del pH, y sin hacer funcionar una bomba de circulación de licor de fermentación 10, se llevó a cabo el cultivo de fermentación discontinua. La cantidad del microorganismos que creció en este cultivo fue 18 en términos de absorbancia a 600 nm. Los resultados de la fermentación discontinua se muestran en la tabla 4.

[Tabla 4]

	Ejemplo comparativo 4	Ejemplo 7	Ejemplo 8
Tiempo de fermentación (h)	28	300	300
Glucosa introducida total (g)	100	6.320	4.750
Etanol producido total (g)	47	2.900	2.120
Glucosa no utilizada (g)	0	50	35
Rendimiento de etanol respecto a azúcar (g/g)	0,47	0,46	0,45
Tasa de producción de etanol (g/l/h)	1,7	4,8	4,7

La tasa de producción de etanol mejoró significativamente mediante el procedimiento de producción de un producto químico, según la presente invención, utilizando el aparato de fermentación mostrado en las figuras 1 y 2.

Ejemplo 9. Producción de ácido pirúvico mediante fermentación continua (No. 1)

La producción de ácido pirúvico se llevó a cabo utilizando el aparato de fermentación continua de tipo de separación por membrana en la figura 1 y un medio de fermentación de ácido pirúvico que tenía la composición mostrada en la tabla 5. El medio se utilizó después de esterilización por vapor a alta presión (121 °C, 15 minutos). Como la membrana de separación, se utilizó la membrana porosa preparada en el ejemplo de referencia 2. A menos que se indique lo contrario, las condiciones operativas en este ejemplo son las siguientes:

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

Membrana de separación utilizada: membrana de filtración de fluoruro de polivinilideno

Área de filtración eficaz del elemento de separación por membrana: 120 cm²

Control de la temperatura: 30 (°C)

Aireación del tanque de reacción de fermentación: 1,5 (l/min)

Velocidad de agitación del tanque de reacción de fermentación: 800 (rpm)

Ajuste del pH: ajustado a pH 5,5 con NaOH 4 N

Esterilización: el tanque de cultivo que incluía el elemento de membrana de separación, y cada medio utilizado, se esterilizaron a alta presión en un autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

Regulación de la cantidad de agua de permeación de la membrana: regulación del caudal mediante diferencia de presión transmembrana

(Desde el inicio de la fermentación continua hasta 100 horas: regulado a de 0,1 kPa o más a 5 kPa o menos, de 100 horas a 180 horas: regulado a de 0,1 kPa o más a 2 kPa o menos, y de 180 horas a 264 horas: regulado a de 0,1 kPa o más a 20 kPa o menos)

La cepa P120-5a de *Torulopsis glabrata* (FERM P-16745) se utilizó como el microorganismo, un medio de fermentación de ácido pirúvico que tenía la composición mostrada en la tabla 5 se utilizó como el medio, y la concentración de ácido pirúvico como un producto se evaluó mediante HPLC en las siguientes condiciones:

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

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

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

La concentración de glucosa se midió con el ensayo Glucose Test Wako C (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.).

[Tabla 5]

Medio de fermentación de ácido pirúvico	
Glucosa	100 g/l
Sulfato de amonio	5 g/l
Dihidrogenofosfato de potasio	1 g/l
Sulfato de magnesio 7H ₂ O	0,5 g/l
Hidrolizados de soja	2 g/l

Medio de fermentación de ácido pirúvico	
Ácido nicotínico	8 mg/l
Clorhidrato de piridoxina	1 mg/l
Biotina	0,05 mg/l
Clorhidrato de tiamina	0,05 mg/l
pH 5,5	

En primer lugar, la cepa P120-5a se cultivó con agitación durante una noche en 5 ml de un medio de fermentación de ácido pirúvico en un tubo de ensayo (antes del precultivo preliminar). El cultivo resultante se inoculó en 100 ml de un medio fresco de fermentación de ácido pirúvico y se cultivó con agitación durante 24 horas a 30 °C en un matraz Sakaguchi de 500 ml (precultivo preliminar). El precultivo preliminar se inoculó en 1,5 l de un medio de fermentación de ácido pirúvico en el aparato de fermentación continua de tipo de separación por membrana mostrado en la figura 1, un tanque de reacción de fermentación 1 se agitó a 800 rpm con un agitador 5 unido a él, seguido por la regulación de la aireación, el control de la temperatura y el ajuste del pH del tanque de reacción de fermentación 1, y el microorganismo se cultivó durante 24 horas (precultivo). Inmediatamente después de que terminó el precultivo, se hizo funcionar la bomba de circulación de licor de fermentación 10, y el microorganismo se cultivó de forma continua en las condiciones en las que, además de las condiciones operativas en el momento del precultivo, se aireó un tanque de separación por membrana 2, un medio de fermentación de ácido pirúvico se alimentó de forma continua, y la cantidad de agua de permeación de la membrana se reguló de modo que la cantidad del licor de fermentación en el aparato de fermentación continua de tipo de separación por membrana se convirtió en 2 l, con lo que se produjo ácido pirúvico mediante fermentación continua. En este ensayo de fermentación continua, la cantidad de agua de permeación de la membrana se reguló y se cambió en las condiciones de control del agua de permeación de la membrana descritas anteriormente, durante lo cual la diferencia de carga hidrostática se midió como diferencia de presión transmembrana con un aparato de regulación de la diferencia de carga hidrostática 3. La concentración de ácido pirúvico producido en el licor de fermentación de permeación de la membrana y la concentración de glucosa residual se midieron en un momento apropiado. Los resultados en el ensayo de fermentación continua durante 300 horas se muestran en la tabla 6.

La producción estable de ácido pirúvico mediante fermentación continua fue viable mediante el procedimiento de producción de un producto químico, según la presente invención, utilizando el aparato de fermentación continua de tipo de separación por membrana en la figura 1. La diferencia de presión transmembrana fluctuaba dentro de 2 kPa en el periodo completo de fermentación continua.

Ejemplo 10. Producción de ácido pirúvico mediante fermentación continua (No. 2)

La producción de ácido pirúvico se llevó a cabo utilizando el aparato de fermentación continua en la figura 2 y un medio de fermentación de ácido pirúvico que tenía la composición mostrada en la tabla 5. El medio se utilizó después de esterilización por vapor a alta presión (121 °C, 15 minutos). Como el material del elemento de membrana de separación, se utilizó un moldeo de acero inoxidable y resina de polisulfona. Como la membrana de separación, se utilizó la membrana porosa preparada en el ejemplo de referencia 2. A menos que se indique lo contrario, las condiciones operativas en este ejemplo son las siguientes:

Capacidad del tanque de reacción: 2 (l)

Membrana de separación utilizada: membrana de filtración de fluoruro de polivinilideno

Área de filtración eficaz del elemento de separación por membrana: 120 cm²

Control de la temperatura: 30 (°C)

Aireación del tanque de reacción de fermentación: 1 (l/min)

Velocidad de alimentación de medio de fermentación de ácido láctico: control variable en el intervalo de 50 a 300 ml/h.

Velocidad de agitación del tanque de reacción de fermentación: 800 (rpm)

Ajuste del pH: ajustado a pH 5,5 con NaOH 4 N

Regulación de la cantidad de agua de permeación de la membrana: regulación del caudal mediante diferencia de presión transmembrana

(Desde el inicio de la fermentación continua hasta 100 horas: regulado a de 0,1 kPa o más a 5 kPa o menos, de 100 horas a 180 horas: regulado a de 0,1 kPa o más a 2 kPa o menos, y

de 180 horas a 264 horas: regulado a de 0,1 kPa o más a 20 kPa o menos)

Esterilización: el tanque de cultivo que incluía el elemento de membrana de separación, y el medio utilizado, se esterilizaron con vapor a alta presión en un autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

La cepa P120-5a de *Torulopsis glabrata* (FERM P-16745) se utilizó como el microorganismo, un medio de fermentación de ácido pirúvico que tenía la composición mostrada en la tabla 5 se utilizó como el medio, y la concentración de ácido pirúvico como un producto se evaluó mediante HPLC en las siguientes condiciones.

En primer lugar, la cepa P120-5a se cultivó con agitación durante una noche en 5 ml de un medio de fermentación

de ácido pirúvico en un tubo de ensayo (antes del precultivo preliminar). El cultivo resultante se inoculó en 100 ml de un medio fresco de fermentación de ácido pirúvico y se cultivó con agitación durante 24 horas a 30 °C en un matraz Sakaguchi de 500 ml (precultivo preliminar). El precultivo preliminar se inoculó en 1,5 l de un medio de fermentación de ácido láctico en el aparato de fermentación continua de tipo de separación por membrana mostrado en la figura 2, un tanque de reacción 1 se agitó a 800 rpm con un agitador 5 unido a él, seguido por la regulación de la aireación, el control de la temperatura y el ajuste del pH del tanque de reacción 1, y el microorganismo se cultivó durante 24 horas (precultivo). Inmediatamente después de que terminó el precultivo, un medio de fermentación de ácido pirúvico se alimentó de forma continua, y el microorganismo se cultivó de forma continua con la cantidad de agua de permeación de la membrana regulada de modo que la cantidad del licor de fermentación en el aparato de fermentación continua de tipo de separación por membrana se convirtió en 1,5 l, con lo que se produjo ácido pirúvico mediante fermentación continua. En este ensayo de fermentación continua, la cantidad de agua de permeación de la membrana se reguló y se cambió en las condiciones de control del agua de permeación de la membrana descritas anteriormente, durante lo cual la diferencia de carga hidrostática se midió como diferencia de presión transmembrana con un aparato de regulación de la diferencia de carga hidrostática 3. La concentración de ácido pirúvico producido en el licor de fermentación de permeación de la membrana y la concentración de glucosa residual se midieron en un momento apropiado. El rendimiento de ácido láctico respecto a azúcar y la tasa de producción de ácido láctico calculada a partir del ácido pirúvico y la glucosa introducida calculada a partir de la concentración de glucosa se muestran en la tabla 6.

Como resultado del ensayo de fermentación durante 300 horas, la producción estable de ácido pirúvico mediante fermentación continua fue viable mediante el procedimiento de producción de un producto químico, según la presente invención, utilizando el aparato de fermentación continua en la figura 2. La diferencia de presión transmembrana fluctuaba dentro de 2 kPa en el periodo completo de fermentación continua.

Ejemplo 11. Producción de ácido pirúvico mediante fermentación continua (No. 3)

Se utilizó el aparato de fermentación continua de tipo de separación por membrana en la figura 1, la cepa NBRC0005 se utilizó como el microorganismo, y todas las demás condiciones fueron las mismas que en el ejemplo 9. Los resultados de la fermentación continua se muestran en la tabla 6. Como resultado del ensayo de fermentación durante 300 horas, la producción estable de ácido pirúvico mediante fermentación continua fue viable mediante el procedimiento de producción de un producto químico, según la presente invención, utilizando el aparato de fermentación continua de tipo de separación por membrana en la figura 1. La diferencia de presión transmembrana fluctuaba dentro de 2 kPa en el periodo completo de fermentación continua.

Ejemplo 12. Producción de ácido pirúvico mediante fermentación continua (No. 4)

Se utilizó el aparato de fermentación continua en la figura 2, la cepa NBRC0005 se utilizó como el microorganismo, y todas las demás condiciones fueron las mismas que en el ejemplo 10. Los resultados de la fermentación continua se muestran en la tabla 6. Como resultado del ensayo de fermentación durante 300 horas, la producción estable de ácido pirúvico mediante fermentación continua fue viable mediante el procedimiento de producción de un producto químico, según la presente invención, utilizando el aparato de fermentación continua en la figura 2. La diferencia de presión transmembrana fluctuaba dentro de 2 kPa en el periodo completo de fermentación continua.

Ejemplo comparativo 5. Producción de ácido pirúvico mediante fermentación discontinua (No. 1)

Como una forma de fermentación utilizando un microorganismo, se llevó a cabo la fermentación discontinua más típica en un fermentador de jarra de 2 l para evaluar su productividad de ácido pirúvico. Como el medio, se utilizó el medio mostrado en la tabla 5 después de esterilización por vapor a alta presión (121 °C, 15 minutos). La cepa P120-5a se utilizó como el microorganismo en este ejemplo comparativo, la concentración de ácido pirúvico como un producto se evaluó mediante HPLC mostrada en el ejemplo 9, y la concentración de glucosa se midió con el ensayo Glucose Test Wako C (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). Las condiciones operativas en este ejemplo comparativo son las siguientes:

Capacidad del tanque de reacción de fermentación (cantidad del medio de fermentación de ácido pirúvico): 1 (l)

Control de la temperatura: 30 (°C)

Aireación del tanque de reacción de fermentación: 1 (l/min)

Velocidad de agitación del tanque de reacción de fermentación: 600 (rpm)

Ajuste del pH: ajustado a pH 5,5 con NaOH 4 N

En primer lugar, la cepa P120-5a se cultivó con agitación durante una noche en 5 ml de un medio de fermentación de ácido pirúvico en un tubo de ensayo (precultivo preliminar). El precultivo preliminar se inoculó en 50 ml de un medio fresco de fermentación de ácido pirúvico y se cultivó con agitación durante 24 horas en un matraz Sakaguchi de 500 ml (precultivo). El precultivo se inoculó en 1 l de un medio de fermentación de ácido pirúvico en un fermentador de jarra y se sometió a fermentación discontinua. Los resultados de la fermentación discontinua se muestran en la tabla 6.

Ejemplo comparativo 6. Producción de ácido pirúvico mediante fermentación discontinua (No. 2)

- 5 Como una forma de fermentación utilizando un microorganismo, se llevó a cabo la fermentación discontinua más típica en un fermentador de jarra de 2 l para evaluar su productividad de ácido pirúvico. En este ejemplo comparativo, la cepa NBRC0005 se utilizó como el microorganismo, y todas las demás condiciones fueron las mismas que en el ejemplo comparativo 3. Los resultados de la fermentación discontinua se muestran en la tabla 6.

[Tabla 6]

	Ejemplo comparativo 3	Ejemplo 9	Ejemplo 10	Ejemplo comparativo 4	Ejemplo 11	Ejemplo 12
Tiempo de fermentación (h)	72	264	264	45	264	264
Glucosa introducida total (g)	100	3.410	2.806	100	3.440	2.660
Piruvato sódico total producido (g)	70	1.790	1.237	58	1.580	1.110
Glucosa no utilizada (g)	0	320	419	0		190
Rendimiento de piruvato sódico respecto a azúcar (g/g)	0,70	0,58	0,52	0,58	0,49	0,45
Tasa de producción de piruvato sódico (g/l/h)	1,0	3,4	3,1	1,28	3,0	2,8

- 10 La tasa de producción de ácido pirúvico mejoró significativamente mediante el procedimiento de producción de un producto químico, según la presente invención, utilizando el aparato de fermentación mostrado en las figuras 1 y 2.

Ejemplo 13. Producción de ácido succínico mediante fermentación continua (No. 1)

- 15 La producción de ácido succínico se llevó a cabo utilizando el aparato de fermentación continua de tipo de separación por membrana en la figura 1.

- 20 A menos que se indique lo contrario, el ácido succínico y la glucosa en la producción de ácido succínico se midieron mediante el siguiente procedimiento. El ácido succínico en un sobrenadante centrifugado de un cultivo se analizó mediante HPLC (Shimadzu LC10A, Monitor del IR: RID-10A, columna: Aminex HPX-87H). La temperatura de la columna fue de 50 °C, y la columna se equilibró con H₂SO₄ 0,01 N y, a continuación, una muestra se inyectó en la columna y se analizó mediante elución con H₂SO₄ 0,01. La glucosa se midió mediante un sensor de glucosa (BF-4, Oji Scientific Instruments).

- 25 El medio se utilizó después de esterilización por vapor a alta presión (121 °C, 15 minutos). Como la membrana de separación, se utilizó la membrana porosa preparada en el ejemplo de referencia 2. A menos que se indique lo contrario, las condiciones operativas en este ejemplo son las siguientes:

- 30 Capacidad del tanque de reacción: 2 (l)
 Capacidad del tanque de separación por membrana: 0,5 (l)
 Membrana de separación utilizada: membrana de filtración de fluoruro de polivinilideno
 Área de filtración eficaz del elemento de separación por membrana: 60 cm²
 Control de la temperatura: 39 (°C)
 Aireación con CO₂ del tanque de reacción: 10 (ml/min)
 35 Aireación con CO₂ del tanque de separación por membrana: 100 (ml/min)
 Velocidad de agitación del tanque de reacción: 100 (rpm)
 Ajuste del pH: ajustado a pH 6,4 con Na₂CO₃ 2 M
 Velocidad de alimentación de medio de fermentación de ácido láctico: control variable en el intervalo de 50 a 300 ml/h.
 40 Cantidad de líquido circulante con un aparato de circulación de licor de fermentación: 0,1 (l/min)
 Regulación de la cantidad de agua de permeación de la membrana: regulación del caudal mediante diferencia de presión transmembrana

- 45 (Desde el inicio de la fermentación continua hasta 100 horas: regulado a de 0,1 kPa o más a 5 kPa o menos, de 100 horas a 200 horas: regulado a de 0,1 kPa o más a 2 kPa o menos, y de 200 horas a 264 horas: regulado a de 0,1 kPa o más a 20 kPa o menos)

- 50 En este ejemplo, se llevó a cabo producción continua de ácido succínico mediante *Anaerobiospirillum succiniciproducens* ATCC53488 como un microorganismo que tiene capacidad de producir ácido succínico. 100 ml de un medio de cultivo de siembra que consistía en 20 g/l de glucosa, 10 g/l de polipeptona, 5 g/l de extracto de levadura, 3 g/l de K₂HPO₄, 1 g/l de NaCl, 1 g/l de (NH₄)₂SO₄, 0,2 g/l de MgCl₂ y 0,2 g/l de CaCl₂·2H₂O se introdujeron en un matraz Erlenmeyer de 125 ml y se esterilizaron mediante calentamiento. En una cámara aeróbica con guantes, se añadieron 1 ml de Na₂CO₃ 30 mM y 0,15 ml de H₂SO₄ 180 mM, y se añadieron además 0,5 ml de una solución reducida que consistía en 0,25 g/l de cisteína·HCl y 0,25 g/l de Na₂S, a continuación, la cepa

ATCC53488 se inoculó en el medio y se cultivó de forma estacionaria a 39 °C durante una noche (precultivo preliminar). 5 ml de una solución reducida que consistía en 0,25 g/l de cisteína·HCl y 0,25 g/l de Na₂S·9H₂O se añadieron a 1,5 l de un medio de fermentación de ácido succínico (tabla 7) en el aparato de fermentación continua de tipo de separación por membrana mostrado en la figura 1, y se le inocularon 50 ml del precultivo preliminar, un tanque de reacción de fermentación 1 se agitó a 200 rpm con un agitador 5 unido a él, seguido por regulación de la aireación con CO₂, control de la temperatura, y ajuste del pH del tanque de reacción de fermentación 1, y el microorganismo se cultivó durante 24 horas (precultivo).

[Tabla 7]

Medio de fermentación de ácido succínico			
	Medio para <i>Actinobacillus succinogenes</i>		
Glucosa	100,0	g/l	
NaCl	1,0	g/l	
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,2	g/l	
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	1,2	g/l	
Na ₂ HPO ₄	0,3	g/l	
K ₂ HPO ₂	-	g/l	
MgCl ₂ · 6H ₂ O	0,2	g/l	
Vitamina B ₁₂	10	µg/l	
Biotina	200	µg/l	
Ácido fólico	200	µg/l	
Tiamina · HCl	500	µg/l	
Riboflavina	500	µg/l	
Niacina	500	µg/l	
Ácido pantoténico	500	µg/l	
Ácido p-aminobenzoico	500	µg/l	
Vitamina B ₆	1	µg/l	
Extracto de levadura	5,0	g/l	
Licor de maceración de maíz	10,0	g/l	
Polipeptona	-	g/l	
NH ₄ Cl	-	g/l	
FeSO ₄ · 7H ₂ O	-	g/l	

Inmediatamente después de que terminó el precultivo, un medio de fermentación de ácido succínico se alimentó de forma continua, y el microorganismo se cultivó de forma continua mientras la cantidad de agua de permeación de la membrana se reguló de modo que la cantidad del licor de fermentación en el aparato de fermentación continua de tipo de separación por membrana se convirtió en 2 l, con lo que se produjo ácido succínico mediante fermentación continua. La cantidad de agua de permeación de la membrana en el ensayo de fermentación continua se reguló cambiando apropiadamente la diferencia de carga hidrostática de modo que la diferencia de carga hidrostática del tanque de reacción de fermentación estaba dentro de 2 m, es decir, la diferencia de presión transmembrana fue de 0,1 o más a 20 kPa o menos. La concentración de ácido succínico producido en el licor de fermentación de permeación de la membrana y la concentración de glucosa residual se midieron en un momento apropiado. La tasa de producción de ácido succínico y el rendimiento de ácido succínico, calculada a partir del ácido succínico y la concentración de glucosa se muestran en la tabla 8. La diferencia de presión transmembrana fluctuaba dentro de 2 kPa en el periodo completo de fermentación continua.

Ejemplo 14. Producción de ácido succínico mediante fermentación continua (No. 2)

La producción de ácido succínico se llevó a cabo utilizando el aparato de fermentación continua en la figura 2. El medio se utilizó después de esterilización por vapor a alta presión (121 °C, 15 minutos). La concentración de ácido succínico y glucosa se midieron de la misma manera que en el ejemplo 13. Como la membrana de separación, se utilizó la membrana porosa preparada en el ejemplo de referencia 2. A menos que se indique lo contrario, las condiciones operativas en este ejemplo son las siguientes:

Capacidad del tanque de reacción: 2 (l)

Membrana de separación utilizada: membrana de filtración de fluoruro de polivinilideno

Área de filtración eficaz del elemento de separación por membrana: 120 cm²

Control de la temperatura: 39 (°C)

Aireación con CO₂ del tanque de reacción de fermentación: 10 (ml/min)

Velocidad de alimentación de medio de fermentación de ácido láctico: control variable en el intervalo de 50 a 300 ml/h.

5 Velocidad de agitación del tanque de reacción de fermentación: 600 (rpm)

Ajuste del pH: ajustado a pH 6,4 con Na₂CO₃ 2 M

Regulación de la cantidad de agua de permeación de la membrana: regulación del caudal mediante diferencia de presión transmembrana

10 (Desde el inicio de la fermentación continua hasta 80 horas: regulado a de 0,1 kPa o más a 5 kPa o menos, de 80 horas a 160 horas: regulado a de 0,1 kPa o más a 2 kPa o menos, y de 160 horas a 280 horas: regulado a de 0,1 kPa o más a 20 kPa o menos)

Esterilización: el tanque de cultivo que incluía el elemento de separación por membrana, y el medio utilizado, se esterilizaron con vapor a alta presión en un autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

15 En este ejemplo, se llevó a cabo producción continua de ácido succínico mediante la cepa ATCC53488 de *Anaerobiospirillum succiniciproducens* como un microorganismo que tiene capacidad de producir ácido succínico. 100 ml de un medio de cultivo de siembra que consistía en 20 g/l de glucosa, 10 g/l de polipeptona, 5 g/l de extracto de levadura, 3 g/l de K₂HPO₄, 1 g/l de NaCl, 1 g/l de (NH₄)₂SO₄, 0,2 g/l de MgCl₂ y 0,2 g/l de CaCl₂·2H₂O se introdujeron en un matraz Erlenmeyer de 125 ml y se esterilizaron mediante calentamiento. En una cámara aeróbica con guantes, se añadieron 1 ml de Na₂CO₃ 30 mM y 0,15 ml de H₂SO₄ 180 mM, y se añadieron además 0,5 ml de una solución reducida que consistía en 0,25 g/l de cisteína·HCl y 0,25 g/l de Na₂S, a continuación, la cepa ATCC53488 se inoculó en el medio y se cultivó de forma estacionaria durante una noche a 39 °C (precultivo preliminar). 5 ml de una solución reducida que consistía en 0,25 g/l de cisteína·HCl y 0,25 g/l de Na₂S·9H₂O se añadieron a 1,5 l de un medio de fermentación de ácido succínico (tabla 7) en el aparato de fermentación continua mostrado en la figura 2, y se le inocularon 50 ml del precultivo preliminar, un tanque de reacción de fermentación 1 se agitó a 600 rpm con un agitador 5 unido a él, seguido por regulación de la aireación con CO₂, control de la temperatura, y ajuste del pH del tanque de reacción de fermentación 1, y el microorganismo se cultivó durante 24 horas (precultivo).

30 Inmediatamente después de que terminó el precultivo, un medio de fermentación de ácido succínico se alimentó de forma continua, y el microorganismo se cultivó de forma continua mientras la cantidad de agua de permeación de la membrana se reguló de modo que la cantidad del licor de fermentación en el aparato de fermentación continua de tipo de separación por membrana se convirtió en 1,5 l, con lo que se produjo ácido succínico mediante fermentación continua. La cantidad de agua de permeación de la membrana en el ensayo de fermentación continua se llevó a cabo cambiando apropiadamente la diferencia de carga hidrostática con un aparato de regulación de la diferencia de carga hidrostática 3 de modo que la carga hidrostática del tanque de reacción de fermentación estaba dentro de 2 m como máximo, es decir, la diferencia de presión transmembrana fue de 0,1 a 20 kPa. La concentración de ácido succínico producido en el licor de fermentación de permeación de la membrana y la concentración de glucosa residual se midieron en un momento apropiado. La tasa de producción de ácido succínico y el rendimiento de ácido succínico, calculados a partir del ácido succínico y la condición de glucosa se muestran en la tabla 8. La diferencia de presión transmembrana fluctuaba dentro de 2 kPa en el periodo completo de fermentación continua.

Ejemplo comparativo 7. Producción de ácido succínico mediante fermentación discontinua

45 La producción de ácido succínico mediante fermentación discontinua de *Anaerobiospirillum succiniciproducens* se llevó a cabo de la siguiente manera.

50 100 ml de un medio de cultivo de siembra que consistía en 20 g/l de glucosa, 10g/l de polipeptona, 5 g/l de extracto de levadura, 3g/l de K₂HPO₄, 1 g/l de NaCl, 1 g/l de (NH₄)₂SO₄, 0,2 g/l de MgCl₂ y 0,2 g/l de CaCl₂·2H₂O se introdujeron en un matraz Erlenmeyer de 125 ml y se esterilizaron mediante calentamiento. En una cámara aeróbica con guantes, se añadieron 1 ml de Na₂CO₃ 30 mM y 0,15 ml de H₂SO₄ 180 mM, y se añadieron además 0,5 ml de una solución reducida que consistía en 0,25 g/l de cisteína·HCl y 0,25 g/l de Na₂S, a continuación la cepa ATCC53488 de *Anaerobiospirillum succiniciproducens* se inoculó en el medio y se cultivó de forma estacionaria durante una noche a 39 °C. 1 l de un medio de fermentación mostrado en la tabla 7 se añadió a un fermentador de mini-jarra (2 l, tipo BMJ, fabricado por ABLE) y se esterilizaron mediante calentamiento (120 °C, 20 min).

60 Se introdujo CO₂ gaseoso a una velocidad de 10 ml/min con un rociador, y se añadieron 10 ml de solución de Na₂CO₃ 3 M, y el pH se ajustó a 6,8 con una solución de ácido sulfúrico. Se añadieron 5 ml de una solución reducida que consistía en 0,25 g/l de cisteína·HCl y 0,25 g/l de Na₂S·9H₂O, y los 50 ml del cultivo de siembra se inocularon en el medio y se cultivaron a una velocidad de agitación de 200 rpm a una temperatura de 39 °C mientras que el pH se ajustó a 6,4 con una solución de Na₂CO₃ 2 M. Los resultados se muestran en la tabla 8.

[Tabla 8]

	Ejemplo comparativo 7	Ejemplo 13	Ejemplo 14
Tiempo de fermentación (h)	39	264	280
Glucosa introducida (g)	49	1.090	1.689
Ácido succínico formado (g)	38	871	1.394
Glucosa no utilizada (g)	1	15	29
Rendimiento (g/g)	0,775	0,81	0,84
Tasa de producción (g/l/h)	0,97	2,2	3,3

La tasa de producción de ácido succínico mejoró significativamente mediante el procedimiento de producción de un producto químico, según la presente invención, utilizando el aparato de fermentación mostrado en las figuras 1 y 2.

Ejemplo 15. Producción de ácido succínico mediante fermentación continua (No. 3)

La producción de ácido succínico se llevó a cabo utilizando el aparato de fermentación continua de tipo de separación por membrana en la figura 1. La concentración de ácido succínico y glucosa se midieron de la misma manera que en el ejemplo 13. El medio se utilizó después de esterilización por vapor a alta presión (121 °C, 15 minutos). Como la membrana de separación, se utilizó la membrana porosa preparada en el ejemplo de referencia 2. Las condiciones operativas en este ejemplo son las mismas que en el ejemplo 13 excepto por la siguiente regulación de la cantidad de agua de permeación de la membrana.

Regulación de la cantidad de agua de permeación de la membrana: regulación del caudal mediante diferencia de presión transmembrana

(Desde el inicio de la fermentación continua hasta 100 horas: regulado a de 0,1 kPa o más a 5 kPa o menos, de 100 horas a 200 horas: regulado a de 0,1 kPa o más a 2 kPa o menos, y de 200 horas a 254 horas: regulado a de 0,1 kPa o más a 20 kPa o menos)

En este ejemplo, se llevó a cabo producción continua de ácido succínico mediante la cepa ATCC55618 de *Actinobacillus succinogenes* como un microorganismo que tiene capacidad de producir ácido succínico. 75 ml de un medio de fermentación de ácido succínico para *Actinobacillus* mostrado en la tabla 9 y 4,0 g de $MgCO_3$ se añadieron a un tubo de ensayo con suero de 100 ml, seguido por reemplazar el gas en el tubo por CO_2 y esterilización bajo calentamiento. Se inocularon 7,5 ml de una suspensión bacteriana de la cepa ATCC55618 y se cultivaron a 37 °C durante 24 horas para preparar un cultivo de siembra (precultivo preliminar).

[Tabla 9]

Medio de fermentación de ácido succínico		
Medio para <i>Anaerobiospirillum succiniciproducens</i>		
Glucosa	50,0	g/l
NaCl	-	g/l
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,2	g/l
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	-	g/l
Na_2HPO_4	-	g/l
K_2HPO_4	1,0	g/l
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	0,2	g/l
Vitamina B ₁₂	-	μg/l
Biotina	-	μg/l
Ácido fólico	-	μg/l
Tiamina · HCl	-	μg/l
Riboflavina	-	μg/l
Niacina	-	μg/l
Ácido pantoténico	-	μg/l
Ácido p-aminobenzoico	-	μg/l
Vitamina B ₆	-	μg/l
Extracto de levadura	5,0	g/l
Licor de maceración de maíz	-	g/l

Medio de fermentación de ácido succínico		
Medio para <i>Anaerobiospirillum succiniciproducens</i>		
Polipeptona	10,0	g/l
NH ₄ Cl	0,4	g/l
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,001	g/l

El aparato de fermentación continua de tipo de separación por membrana mostrado en la figura 1 se cargó con 1,5 l de un medio de fermentación de ácido succínico (tabla 9), y se le inocularon 75 ml del precultivo preliminar. El microorganismo se cultivó de forma continua de la misma manera que en el ejemplo 13 excepto en que la aireación con CO₂ en el baño de reacción de fermentación 1 fue de 75 ml/min, la aireación con CO₂ en el tanque de membrana de separación fue de 150 ml/min, la temperatura fue de 39 °C, y el pH se ajustó a 6,8 con NaCO₃ 5,5 M. La concentración de ácido succínico producido en el licor de fermentación de permeación de la membrana y la concentración de glucosa residual se midieron en un momento apropiado. La tasa de producción de ácido succínico y el rendimiento de ácido succínico, calculada a partir del ácido succínico y la concentración de glucosa se muestra en la tabla 10. La diferencia de presión transmembrana fluctuaba dentro de 2 kPa en el periodo completo de fermentación continua.

Ejemplo 16. Producción de ácido succínico mediante fermentación continua (No. 4)

La producción de ácido succínico se llevó a cabo utilizando el aparato de fermentación continua en la figura 2. El medio se utilizó después de esterilización por vapor a alta presión (121 °C, 15 minutos). La concentración de ácido succínico y glucosa se midieron de la misma manera que en el ejemplo 13. Como la membrana de separación, se utilizó la membrana porosa preparada en el ejemplo de referencia 2. Las condiciones operativas en este ejemplo son las mismas que en el ejemplo 14 excepto por la siguiente regulación de la cantidad de agua de permeación de la membrana.

Regulación de la cantidad de agua de permeación de la membrana: regulación del caudal mediante diferencia de presión transmembrana

(Desde el inicio de la fermentación continua hasta 100 horas: regulado a de 0,1 kPa o más a 5 kPa o menos, de 100 horas a 200 horas: regulado a de 0,1 kPa o más a 2 kPa o menos, y de 200 horas a 280 horas: regulado a de 0,1 kPa o más a 20 kPa o menos)

En este ejemplo, se llevó a cabo la producción continua de ácido succínico mediante la cepa ATCC55618 de *Actinobacillus succinogenes* como un microorganismo que tiene capacidad de producir ácido succínico. El cultivo continuo se llevó a cabo de la misma manera que en el ejemplo 14 excepto en que en la producción continua de ácido succínico por *Actinobacillus succinogenes*, la aireación con CO₂ en el baño de reacción de fermentación fue de 75 ml/min, y el pH se ajustó a 6,8 con NaCO₃ 5,5 M.

En primer lugar, 75 ml de un medio de fermentación de ácido succínico para *Actinobacillus* mostrado en la tabla 9 y 4,0 g de MgCO₃ se añadieron a un tubo de ensayo con suero de 100 ml, seguido por reemplazar el gas en el tubo por CO₂ y esterilización bajo calentamiento. Se inocularon en el medio 7,5 ml de una suspensión bacteriana de la cepa ATCC55618 previamente almacenada en estado congelado y se cultivaron a 37 °C durante 24 horas para preparar un cultivo de siembra (precultivo preliminar). El aparato de fermentación continua mostrado en la figura 2 se cargó con 1,5 l de un medio de fermentación de ácido succínico (tabla 7), y 75 ml del precultivo preliminar se inocularon en el medio y se cultivaron durante 24 horas con el pH mantenido a 6,8 (precultivo). Después de que el precultivo finalizó, el medio de fermentación de ácido succínico en la tabla 9 se alimentó de forma continua, y la cantidad de agua de permeación de la membrana se reguló de modo que la cantidad del licor de fermentación en el aparato de fermentación continua de tipo de separación por membrana en la figura 2 se convirtió en 1,5 l, con lo que se produjo ácido pirúvico mediante fermentación continua. La concentración de ácido pirúvico producido en el licor de fermentación de permeación de la membrana y la concentración de glucosa residual se midieron en un momento apropiado. La tasa de producción de ácido succínico y el rendimiento de ácido succínico, calculados a partir del ácido succínico y la concentración de glucosa se muestran en la tabla 10. La diferencia de presión transmembrana fluctuaba dentro de 2 kPa en el periodo completo de fermentación continua.

Ejemplo comparativo 8. Producción de ácido succínico mediante fermentación continua (No. 2)

La producción de ácido succínico por *Actinobacillus succinogenes* se llevó a cabo de la siguiente manera.

Se añadieron 50 ml de un medio de fermentación de ácido succínico para *Actinobacillus* mostrado en la tabla 9 y 4,0 g de MgCO₃ a un tubo de ensayo con suero de 100 ml, seguido por reemplazar el gas en el tubo por CO₂ y esterilización bajo calentamiento. Se inocularon en el medio 5 ml de una suspensión bacteriana de *Actinobacillus succinofenes* ATCC55618 previamente crioconservada y se cultivaron a 37 °C durante 24 horas para preparar un

cultivo de siembra. 1 l del medio de fermentación mostrado en la tabla 9 se ajustó a pH 6,8 y se añadió a un fermentador de mini-jarra (2 l, tipo BMJ, fabricado por ABLE) y se esterilizó mediante calentamiento (120 °C, 20 min). Se introdujo CO₂ gaseoso a una velocidad de 50 ml/min con un rociador, y la temperatura se reguló a 39 °C. Se inocularon en el medio 50 ml del cultivo de siembra anterior y se cultivaron en agitación a 600 rpm con una pala agitadora unida a él mientras el pH se ajustó a 6,8 con NaCO₃ 5,5 M. Los resultados se muestran en la tabla 10.

[Tabla 10]

	Ejemplo comparativo 8	Ejemplo 15	Ejemplo 16
Tiempo de fermentación (h)	49	254	280
Glucosa introducida (g)	100	1.637	2.182
Ácido succínico formado (g)	72	1.193	1.520
Glucosa no utilizada (g)	4	25	11
Rendimiento (g/g)	0,75	0,74	0,70
Tasa de producción (g/l/h)	1,12	3,13	3,62

La tasa de producción de ácido succínico mejoró significativamente mediante el procedimiento de producción de un producto químico según la presente invención utilizando los aparatos de fermentación mostrados en las figuras 1 y 2.

Ejemplo 17. Producción continua de ácido succínico mediante fermentación continua (No. 5)

La producción de ácido succínico se llevó a cabo utilizando el aparato de fermentación continua de tipo de separación por membrana en la figura 1. La concentración de ácido succínico y glucosa se midieron de la misma manera que en el ejemplo 13. El medio se utilizó después de esterilización por vapor a alta presión (121 °C, 15 minutos). Como la membrana de separación, se utilizó la membrana porosa preparada en el ejemplo de referencia 2. Las condiciones operativas en este ejemplo son las mismas que en el ejemplo 13 excepto por la siguiente regulación de la cantidad de agua de permeación de la membrana.

Regulación de la cantidad de agua de permeación de la membrana: regulación del caudal mediante diferencia de presión transmembrana

(Desde el inicio de la fermentación continua hasta 80 horas: regulado a de 0,1 kPa o más a 5 kPa o menos, de 80 horas a 140 horas: regulado a de 0,1 kPa o más a 2 kPa o menos, y de 140 horas a 200 horas: regulado a de 0,1 kPa o más a 20 kPa o menos)

En este ejemplo, se llevó a cabo la producción continua de ácido succínico mediante la cepa B ATCC11303 de *Escherichia coli* como un microorganismo que tiene capacidad de producir ácido succínico. Se introdujeron 150 ml de un medio de cultivo de siembra que consistía en 12 g/l de glucosa, 10 g/l de polipeptona, 5 g/l de extracto de levadura, 1 g/l de K₂HPO₄, 1 g/l de NaCl y 0,2 g/l de MgCl₂ en un matraz Erlenmeyer de 200 ml y se ajustaron a pH 6,8. Después de que se añadieron 7,5 g de MgCO₃, el medio se esterilizó por calentamiento y se enfrió a temperatura ambiente, y en una cámara aeróbica con guantes, la cepa ATCC11303 se inoculó en el medio y se cultivó de forma estacionaria durante una noche a 37 °C (precultivo preliminar). El aparato de fermentación continua mostrado en la figura 1 se cargó con 1,5 l de un medio de fermentación de ácido succínico que consistía en 12 g/l de glucosa, 10 g/l de polipeptona, 5 g/l de extracto de levadura, 1 g/l de K₂HPO₄, 1 g/l de NaCl y 0,2 g/l de MgCl₂, y se inocularon 150 ml del precultivo preliminar en el medio. La fermentación continua de ácido succínico se llevó a cabo en las mismas condiciones que en el ejemplo 13 excepto en que la temperatura de fermentación fue de 37 °C.

Después del precultivo durante 24 horas, el microorganismo se cultivó de forma continua mientras que el medio de fermentación de ácido succínico mostrado en la tabla 11 se alimentó de forma continua y la cantidad de agua de permeación de la membrana se reguló de modo que la cantidad del licor de fermentación en el aparato de fermentación continua se convirtió en 2 l.

[Tabla 11]

Medio de fermentación de ácido succínico		
Glucosa	50	g/l
Polipeptona	10	g/l
Extracto de levadura	5	g/l
Dihidrogenofosfato de potasio	1	g/l
Cloruro de sodio	1	g/l
Cloruro de magnesio	0,2	g/l

La concentración de ácido succínico producido en el licor de fermentación de permeación de la membrana y la concentración de glucosa residual se midieron en un momento apropiado. La tasa de producción de ácido succínico

y el rendimiento de ácido succínico, calculados a partir del ácido succínico y la concentración de glucosa se muestran en la tabla 12. La diferencia de presión transmembrana fluctuaba dentro de 2 kPa en el periodo completo de fermentación continua.

5 Ejemplo 18. Producción continua de ácido succínico mediante fermentación continua (No. 6)

La producción de ácido succínico se llevó a cabo utilizando el aparato de fermentación continua en la figura 2. El medio se utilizó después de esterilización por vapor a alta presión (121 °C, 15 minutos). La concentración de ácido succínico y glucosa se midieron de la misma manera que en el ejemplo 13. Como la membrana de separación, se utilizó la membrana porosa preparada en el ejemplo de referencia 2. Las condiciones operativas en este ejemplo son las mismas que en el ejemplo 14 excepto por la siguiente regulación de la cantidad de agua de permeación de la membrana.

Regulación de la cantidad de agua de permeación de la membrana: regulación del caudal mediante diferencia de presión transmembrana

(Desde el inicio de la fermentación continua hasta 80 horas: regulado a de 0,1 kPa o más a 5 kPa o menos, de 80 horas a 120 horas: regulado a de 0,1 kPa o más a 2 kPa o menos, y de 120 horas a 180 horas: regulado a de 0,1 kPa o más a 20 kPa o menos)

En este ejemplo, se llevó a cabo producción continua de ácido succínico mediante la cepa B ATCC11303 de *Escherichia coli* como un microorganismo que tiene capacidad de producir ácido succínico. Se introdujeron 150 ml de un medio de cultivo de siembra que consistía en 12 g/l de glucosa, 10 g/l de polipeptona, 5 g/l de extracto de levadura, 1 g/l de K₂HPO₄, 1 g/l de NaCl y 0,2 g/l de MgCl₂ en un matraz Erlenmeyer de 200 ml y se ajustaron a pH 6,8. Después de que se añadieron 7,5 g de MgCO₃, el medio se esterilizó por calentamiento y se enfrió a temperatura ambiente, y la cepa ATCC11303 se inoculó en el medio y se cultivó de forma estacionaria durante una noche a 37 °C (precultivo preliminar). El aparato de fermentación continua mostrado en la figura 2 se cargó con 1,5 l de un medio de fermentación de ácido succínico que consistía en 12 g/l de glucosa, 10 g/l de polipeptona, 5 g/l de extracto de levadura, 1 g/l de K₂HPO₄, 1 g/l de NaCl y 0,2 g/l de MgCl₂, y se inocularon 150 ml del precultivo preliminar en el medio. El microorganismo se cultivó durante 24 horas a una temperatura de 37 °C mientras el pH se ajustó a 6,8 con NaCO₃ 5,5 M (precultivo). Después de que el precultivo finalizó, el microorganismo se cultivó mientras que el medio de fermentación de ácido succínico mostrado en la tabla 11 se alimentó de forma continua y la cantidad de agua de permeación de la membrana se reguló de modo que la cantidad del licor de fermentación en el aparato de fermentación continua se convirtió en 1,5 l. La tasa de producción de ácido succínico y el rendimiento de ácido succínico, calculados a partir del ácido succínico y la concentración de glucosa se muestran en la tabla 12. La diferencia de presión transmembrana fluctuaba dentro de 2 kPa en el periodo completo de fermentación continua.

Ejemplo comparativo 9. Producción de ácido succínico mediante fermentación discontinua (No. 3)

La producción de ácido succínico mediante fermentación discontinua con *Escherichia coli* se llevó a cabo de la siguiente manera.

Se introdujeron 100 ml de un medio de cultivo de siembra que consistía en 12 g/l de glucosa, 10 g/l de polipeptona, 5 g/l de extracto de levadura, 1 g/l de K₂HPO₄, 1 g/l de NaCl y 0,2 g/l de MgCl₂ en un matraz Erlenmeyer de 1.250 ml y se ajustaron a pH 6,8. Después de que se añadieron 5 g de MgCO₃, el medio se esterilizó por calentamiento y se enfrió a temperatura ambiente, y en una cámara aeróbica con guantes, la cepa B ATCC11303 de *Escherichia coli* se inoculó en el medio y se cultivó de forma estacionaria durante una noche a 37 °C. 1 l de un medio de fermentación que consistía en 12 g/l de glucosa, 10 g/l de polipeptona, 5 g/l de extracto de levadura, 1 g/l de K₂HPO₄, 1 g/l de NaCl y 0,2 g/l de MgCl₂ se ajustó a pH 6,8, se añadió a un fermentador de mini-jarra (2 l, tipo BMJ, fabricado por ABLE) y se esterilizó mediante calentamiento (120 °C, 20 min). Se introdujo CO₂ gaseoso a una velocidad de 50 ml/min con un rociador, y la temperatura se reguló a 37 °C. Se inocularon en el medio 100 ml del cultivo de siembra anterior y se cultivaron en agitación a 600 rpm con una pala agitadora unida a él mientras que el pH se ajustó a 6,8 con NaCO₃ 5,5 M. El cultivo se llevó a cabo mientras que 200 ml de solución de glucosa a 100 g/l se añadieron poco a poco de modo que la concentración de glucosa en el cultivo no superó los 20 g/l. Los resultados se muestran en la tabla 12.

[Tabla 12]

	Ejemplo comparativo 9	Ejemplo 17	Ejemplo 18
Tiempo de fermentación (h)	36	200	180
Glucosa introducida (g)	32	732	850
Ácido succínico formado (g)	3	72	81
Glucosa no utilizada (g)	0	12	40
Rendimiento (g/g)	0,1	0,1	0,1
Tasa de producción (g/l/h)	0,09	0,24	0,30

La tasa de producción de ácido succínico mejoró significativamente mediante el procedimiento de producción de un

producto químico, según la presente invención, utilizando los aparatos de fermentación mostrados en las figuras 1 y 2.

Ejemplo 19. Producción de 1,3-propanodiol mediante fermentación continua (No. 1)

La producción de 1,3-propanodiol se llevó a cabo utilizando el aparato de fermentación continua de tipo de separación por membrana en la figura 1 y un medio de producción de 1,3-propanodiol con la composición mostrada en la tabla 13.

En primer lugar, se describe el procedimiento de aislamiento, identificación y medición de 1,3-propanodiol como un producto.

La conversión de glicerol en 1,3-propanodiol se confirmó mediante HPLC. Este análisis se llevó a cabo utilizando procedimientos y materiales estándar disponibles para los expertos en el sector técnico de la cromatografía. En un procedimiento adecuado, se utilizó un sistema de HPLC Waters Maxima 820 utilizando detección UV (210 nm) e IR. Se inyectó una muestra a un caudal de 0,5 ml/min en una columna Shodex SH-1011 (8 mm×300 mm, adquirida de Waters, Milford, MA) regulada a una temperatura de 50 °C y equipada con una precolumna Shodex SH-1011P (6 mm×50 mm), con H₂SO₄ 0,01 N como una fase móvil. Cuando se debía llevar a cabo análisis cuantitativo, se utilizó ácido trimetilacético de cantidad conocida como estándar externo para preparar la muestra. Los tiempos de retención de glucosa (detección del IR), glicerol, 1,3-propanodiol (detección del IR) y ácido trimetilacético (UV y detección del IR) fueron de aproximadamente 15 minutos, 20 minutos, 26 minutos y 35 minutos, respectivamente.

La producción de 1,3-propanodiol se confirmó mediante GC/MS. Este análisis se llevó a cabo utilizando procedimientos y materiales estándar disponibles para los expertos en el sector técnico de GC/MS. Por ejemplo, se utilizó un sistema cromatográfico de gases de Hewlett Packard 5890 Serie II conectado a un detector selectivo de masa (EI) de Hewlett Packard 5971 Serie y una columna HP-INNOWax (longitud 30 m, diámetro interno 0,25 mm, grosor de película 0,25 µm). El tiempo de retención y el espectro de masas del 1,3-propanodiol formado se compararon con los del 1,3-propanodiol estándar (m/e: 57, 58).

También se llevó a cabo la derivación de una muestra. Se añadieron 30 µl de ácido perclórico concentrado (70 % v/v) a 1,0 ml de muestra (por ejemplo, un sobrenadante de cultivo). Después de mezclar, la muestra se liofilizó. Se añadió una mezcla 1:1 (300 µl) de bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida:piridina al material liofilizado, después se mezcló vigorosamente y se dejó a 65 °C durante 1 hora. La muestra se hizo transparente eliminando los materiales insolubles por centrifugación. El líquido resultante se separó en 2 fases, y su fase superior se usó en el análisis. La muestra se sometió a cromatografía en una columna DB-5 (48 m, diámetro interno de 0,25 mm, grosor de película de 0,25 µm, de J&W Scientific), y el tiempo de retención y el espectro de masas del derivado de 1,3-propanodiol obtenido del sobrenadante del cultivo se compararon con los obtenidos de la muestra estándar. El espectro de masas del 1,3-propanodiol derivatizado de TMS contiene 205, 177, 130 y 115 unidades de masa atómica (UMA) de iones característicos.

El medio se utilizó después de esterilización por vapor a alta presión (121 °C, 15 minutos). Como el material del elemento de membrana de separación, se utilizó un moldeado de acero inoxidable y resina de polisulfona. Como la membrana de separación, se utilizó la membrana porosa preparada en el ejemplo de referencia 2. A menos que se indique lo contrario, las condiciones operativas en este ejemplo son las siguientes:

Capacidad del tanque de reacción: 2 (l)

Membrana de separación utilizada: membrana de filtración de fluoruro de polivinilideno

Área de filtración eficaz del elemento de separación por membrana: 120 cm²

Control de la temperatura: 37 (°C)

Aireación del tanque de reacción de fermentación: 0,6 (l/min) de nitrógeno gaseoso

Velocidad de agitación del tanque de reacción de fermentación: 800 (rpm)

Ajuste del pH: ajustado a pH 7,0 con NaOH 5 N

Esterilización: el tanque de cultivo que incluía el elemento de membrana de separación, y el medio utilizado, se esterilizaron con vapor a alta presión en un autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

Regulación de la cantidad de agua de permeación de la membrana: regulación del caudal mediante diferencia de presión transmembrana

(Desde el inicio de la fermentación continua hasta 100 horas: regulado a de 0,1 kPa o más a 5 kPa o menos, de 100 horas a 200 horas: regulado a de 0,1 kPa o más a 2 kPa o menos, y de 200 horas a 320 horas: regulado a de 0,1 kPa o más a 20 kPa o menos)

La cepa ATCC 25955 de *Klebsiella pneumoniae* se utilizó como el microorganismo, un medio de fermentación de 1,3-propanodiol que tenía la composición mostrada en la tabla 13 se utilizó como el medio, y la concentración de 1,3-propanodiol como un producto se evaluó mediante el procedimiento de HPLC descrito anteriormente.

La concentración de glucosa se midió con el ensayo Glucose Test Wako C (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.).

[Tabla 13]

medio de fermentación de 1,3-propanodiol

Glucosa	10 g/l
Glicerol	40 g/l
Sulfato de amonio	5,35 g/l
Cloruro de potasio	0,75 g/l
Dihidrogenofosfato de sodio	1,38 g/l
Sulfato de magnesio · 7H ₂ O	0,26 g/l
Sulfato de sodio	0,28 g/l
Ácido cítrico	0,42 g/l
Extracto de levadura	1 g/l
Cloruro de calcio · 2H ₂ O	0,29 mg/l
Cloruro de hierro · 6H ₂ O	0,025 g/l
Cloruro de manganeso · 6H ₂ O	0,01 g/l
Cloruro de zinc	0,003 g/l
Cloruro de cobalto · 6H ₂ O	0,002 g/l
Cloruro de cobre · 6H ₂ O	0,85 mg/l
	pH 7,0

En primer lugar, la cepa ATCC 25955 de *Klebsiella pneumoniae* se cultivó con agitación durante una noche en 5 ml de un medio de producción de 1,3-propanodiol en un tubo de ensayo (antes del precultivo preliminar). El cultivo resultante se inoculó en 50 ml de un medio fresco de producción de 1,3-propanodiol y se cultivó con agitación durante 24 horas a 30 °C en un matraz Sakaguchi de 500 ml (precultivo preliminar). El precultivo preliminar se inoculó en 1,5 l de un medio de producción de 1,3-propanodiol en el aparato de fermentación continua de tipo de separación por membrana mostrado en la figura 1, un tanque de reacción de fermentación 1 se agitó a 800 rpm con un agitador 5 unido a él, seguido por la regulación de la aireación, el control de la temperatura y el ajuste del pH del tanque de reacción 1, y el microorganismo se cultivó durante 24 horas (precultivo). Inmediatamente después de que terminó el precultivo, se hizo funcionar la bomba de circulación de licor de fermentación, y el microorganismo se cultivó de forma continua en las condiciones en las que, además de las condiciones operativas en el momento del precultivo, se aireó un tanque de separación por membrana 2, un medio de producción de 1,3-propanodiol (concentración de glicerol: 100 g/l) se alimentó de forma continua, y la cantidad de agua de permeación de la membrana se reguló de modo que la cantidad del licor de fermentación en el aparato de fermentación continua se convirtió en 1,5 l, con lo que se produjo 1,3-propanodiol mediante fermentación continua. En este ensayo de fermentación continua, la cantidad de agua de permeación de la membrana se reguló y se cambió en las condiciones de control del agua de permeación de la membrana descritas anteriormente, durante lo cual la diferencia de carga hidrostática se midió como diferencia de presión transmembrana con un aparato de regulación de la diferencia de carga hidrostática 3. La concentración de 1,3-propanodiol producido en el licor de fermentación de permeación de la membrana y la concentración de glucosa residual se midieron en un momento apropiado. La tasa de producción de 1,3-propanodiol calculada a partir del 1,3-propanodiol y el glicerol introducido se muestra en la tabla 14.

Como resultado del ensayo de fermentación durante 320 horas, la producción estable de 1,3-propanodiol mediante fermentación continua fue viable mediante el procedimiento de producción de un producto químico, según la presente invención, utilizando el aparato de fermentación continua de tipo de separación por membrana mostrado en la figura 1. La diferencia de presión transmembrana fluctuaba dentro de 2 kPa en el periodo completo de fermentación continua.

Ejemplo 20. Producción de 1,3-propanodiol mediante fermentación continua (No. 2)

La producción de 1,3-propanodiol se llevó a cabo utilizando el aparato de fermentación continua en la figura 2 y un medio de producción de 1,3-propanodiol con la composición mostrada en la tabla 13.

El medio se utilizó después de esterilización por vapor a alta presión (121 °C, 15 minutos). Como el material del elemento de membrana de separación, se utilizó un moldeado de acero inoxidable y resina de polisulfona. Como la membrana de separación, se utilizó la membrana porosa preparada en el ejemplo de referencia 2. A menos que se indique lo contrario, las condiciones operativas en este ejemplo son las siguientes:

Capacidad del tanque de reacción de fermentación: 2 (l)
 Membrana de separación utilizada: membrana de filtración de fluoruro de polivinilideno
 Área de filtración eficaz del elemento de separación por membrana: 120 cm²
 Control de la temperatura: 37 (°C)

Aireación del tanque de reacción de fermentación: 0,6 (l/min) de nitrógeno gaseoso

Velocidad de agitación del tanque de reacción de fermentación: 800 (rpm)

Ajuste del pH: ajustado a pH 7,0 con NaOH 5 N

5 Esterilización: el tanque de cultivo que incluía el elemento de membrana de separación, y el medio utilizado, se esterilizaron con vapor a alta presión en un autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

Regulación de la cantidad de agua de permeación de la membrana: regulación del caudal mediante diferencia de presión transmembrana

10 (Desde el inicio de la fermentación continua hasta 100 horas: regulado a de 0,1 kPa o más a 5 kPa o menos, de 100 horas a 200 horas: regulado a de 0,1 kPa o más a 2 kPa o menos, y de 200 horas a 264 horas: regulado a de 0,1 kPa o más a 20 kPa o menos)

15 La cepa ATCC 25955 de *Klebsiella pneumoniae* se utilizó como el microorganismo, un medio de producción de 1,3-propanodiol que tenía la composición mostrada en la tabla 9 se utilizó como el medio, y la concentración de 1,3-propanodiol como un producto se midió mediante el procedimiento de HPLC descrito anteriormente. La concentración de glucosa se midió con el ensayo Glucose Test Wako C (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.).

20 En primer lugar, la cepa ATCC 25955 de *Klebsiella pneumoniae* se cultivó con agitación durante una noche en 5 ml de un medio de producción de 1,3-propanodiol en un tubo de ensayo (antes del precultivo preliminar). El cultivo resultante se inoculó en 50 ml de un medio fresco de producción de 1,3-propanodiol y se cultivó con agitación durante 24 horas a 30 °C en un matraz Sakaguchi de 500 ml (precultivo preliminar). El precultivo preliminar se inoculó en 1,5 l de un medio de producción de 1,3-propanodiol en el aparato de fermentación continua de tipo de separación por membrana mostrado en la figura 2, un tanque de reacción de fermentación 1 se agitó a 800 rpm con un agitador 5 unido a él, seguido por la regulación de la aireación, el control de la temperatura y el ajuste del pH del tanque de reacción de fermentación 1, y el microorganismo se cultivó durante 24 horas (precultivo). Inmediatamente después de que terminó el precultivo, el microorganismo se cultivó de forma continua mientras un medio de producción de 1,3-propanodiol (concentración de glicerol: 100 g/l) se alimentó de forma continua, y la cantidad de agua de permeación de la membrana se reguló de modo que la cantidad del licor de fermentación en el aparato de fermentación continua con membrana integrada se convirtió en 1,5 l, con lo que se produjo 1,3-propanodiol mediante fermentación continua. En este ensayo de fermentación continua, la cantidad de agua de permeación de la membrana se reguló y se cambió en las condiciones de control del agua de permeación de la membrana descritas anteriormente, durante lo cual la diferencia de carga hidrostática se midió como diferencia de presión transmembrana con un aparato de regulación de la diferencia de carga hidrostática 3. La concentración de 1,3-propanodiol producido en el licor de fermentación de permeación de la membrana y la concentración de glucosa residual se midieron en un momento apropiado. La tasa de producción de 1,3-propanodiol calculada a partir del 1,3-propanodiol medido y el glicerol introducido se muestra en la tabla 14. Como resultado del ensayo de fermentación durante 264 horas, la producción estable de 1,3-propanodiol mediante fermentación continua fue viable mediante el procedimiento de producción de un producto químico, según la presente invención, utilizando el aparato de fermentación continua en la figura 2. La diferencia de presión transmembrana fluctuaba dentro de 2 kPa en el periodo completo de fermentación continua.

Ejemplo comparativo 10. Producción de 1,3-propanodiol mediante fermentación discontinua alimentada

45 Como una forma de fermentación utilizando un microorganismo, la fermentación discontinua alimentada más típica se llevó a cabo en un fermentador de jarra de 2 l para evaluar su productividad de 1,3-propanodiol. El medio se utilizó después de esterilización por vapor a alta presión (121 °C, 15 minutos). La cepa ATCC 25955 de *Klebsiella pneumoniae* se utilizó como el microorganismo en este ejemplo comparativo, la concentración de 1,3-propanodiol como un producto se evaluó mediante HPLC, y la concentración de glucosa se midió con el ensayo Glucose Test Wako C (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). Las condiciones operativas en el ejemplo comparativo 10 son las siguientes:

Capacidad del tanque de reacción de fermentación (cantidad del medio de producción de 1,3-propanodiol): 1,0 (l)

Control de la temperatura: 37 (°C)

Aireación del tanque de reacción de fermentación: 0,4 (l/min) de nitrógeno gaseoso

55 Velocidad de agitación del tanque de reacción de fermentación: 300 (rpm)

Ajuste del pH: ajustado a pH 7,0 con NaOH 5 N

60 En primer lugar, la cepa de ATCC 25955 *Klebsiella pneumoniae* se cultivó con agitación durante una noche en 5 ml de un medio de producción de 1,3-propanodiol en un tubo de ensayo (precultivo preliminar). El precultivo preliminar se inoculó en 50 ml de un medio fresco de producción de 1,3-propanodiol y se cultivó con agitación durante 24 horas en un matraz Sakaguchi de 500 ml (precultivo). El precultivo se inoculó en 1,5 l de un medio de producción de 1,3-propanodiol en un fermentador de jarra. El microorganismo se sometió a fermentación discontinua alimentada alimentando de forma continua un medio de producción de 1,3-propanodiol (concentración de glicerol: 500 g/l) de modo que la concentración de glicerol aumentó de 0 g/l a 10 g/l. Los resultados se muestran en la tabla 14.

65

[Tabla 14]

		Ejemplo comparativo 10	Ejemplo 19	Ejemplo 20
Tiempo de fermentación	(h)	42	320	264
Glicerol introducido	(g)	200	1.620	1.320
1,3-Propanodiol producido	(g)	53	391	313
Glicerol no utilizado	(g)	5	55	50
Rendimiento de 1,3-propanodiol	(g/g)	0,27	0,25	0,25
Tasa de producción de 1,3-propanodiol	(g/litro/h)	1,26	2,50	3,33

La tasa de producción de 1,3-propanodiol mejoró significativamente mediante el procedimiento de producción de un producto químico según la presente invención utilizando los aparatos de fermentación mostrados en las figuras 1 y 2.

Ejemplo 21. Producción de ácido itacónico mediante fermentación continua (No. 1)

La producción de ácido itacónico se llevó a cabo utilizando el aparato de fermentación continua de tipo de separación por membrana en la figura 1. El medio que tenía la composición mostrada en la tabla 15 se utilizó después de esterilización por vapor a alta presión (121 °C, 15 minutos). Como el material del elemento de membrana de separación, se utilizó un moldeo de acero inoxidable y resina de polisulfona. Como la membrana de separación, se utilizó la membrana porosa preparada en el ejemplo de referencia 2. A menos que se indique lo contrario, las condiciones operativas en este ejemplo son las siguientes:

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

Membrana de separación utilizada: membrana de filtración de fluoruro de polivinilideno

Área de filtración eficaz del elemento de separación por membrana: 120 cm²

Control de la temperatura: 35 (°C)

Aireación del tanque de reacción de fermentación: 1,5 (l/min)

Velocidad de agitación del tanque de reacción de fermentación: 200 (rpm)

Esterilización: el tanque de cultivo que incluía el elemento de membrana de separación, y el medio utilizado, se esterilizaron con vapor a alta presión en un autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

Ajuste del pH: ajustado a pH 5 con NaOH 4 N

Regulación de la cantidad de agua de permeación de la membrana: regulación del caudal mediante diferencia de presión transmembrana

(Desde el inicio de la fermentación continua hasta 100 horas: regulado a de 0,1 kPa o más a 5 kPa o menos,

de 100 horas a 200 horas: regulado a de 0,1 kPa o más a 2 kPa o menos, y

de 200 horas a 300 horas: regulado a de 0,1 kPa o más a 20 kPa o menos)

La cepa ATCC10020 de *Aspergillus terreus* se utilizó como el microorganismo, un medio de fermentación de ácido itacónico que tenía la composición mostrada en la tabla 11 se utilizó como el medio, la concentración de ácido itacónico como un producto se midió mediante un procedimiento de Koppeshaar ("Biseibutsu Kogaku Kouza (Bacterial Optics Course)", Vol. 5, "Kabino Riyō Kogyō (Use and Industry of Mold)" págs. 72-73, publicado por Kyoritsu Shuppan Co., Ltd. (1956)). La concentración de glucosa se midió con el ensayo Glucose Test Wako C (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.).

[Tabla 15]

Medio de fermentación de ácido itacónico

Precultivo Fermentación continua/discontinua

	Precultivo	Fermentación continua/discontinua	
Glucosa	55	70	g/l
Licor de maceración de maíz	3	2,0	g/l
Nitrato de amonio	5	3,0	g/l
Sulfato de magnesio	2	0,1	g/l
Adekanol LG126 (agente antiespumante)	-	0,1	g/l

En primer lugar, la cepa ATCC10020 de *Aspergillus terreus* se cultivó con agitación durante una noche en 5 ml de un Medio de precultivo mostrado en la tabla 15 en un tubo de ensayo (antes del precultivo preliminar). El cultivo resultante se inoculó en 100 ml de un medio de precultivo fresco y se cultivó con agitación durante 48 horas a 35 °C en un matraz Sakaguchi de 500 ml (precultivo preliminar). El precultivo preliminar se inoculó en 1,5 l de un medio de fermentación continua/discontinua en el aparato de fermentación continua de tipo de separación por membrana mostrado en la figura 1, un tanque de reacción de fermentación 1 se agitó a 200 rpm con un agitador 5 unido a él, seguido por la regulación de la aireación y el control de la temperatura del tanque de reacción de fermentación 1, y el microorganismo se cultivó durante 24 horas (precultivo). Inmediatamente después de que terminó el precultivo, se hizo funcionar la bomba de circulación de licor de fermentación, y el microorganismo se cultivó de forma continua en

las condiciones en las que, además de las condiciones operativas en el momento del precultivo, se aireó un tanque de separación por membrana 2, un medio de fermentación de ácido itacónico se alimentó de forma continua, y la cantidad de agua de permeación de la membrana se reguló de modo que la cantidad del licor de fermentación en el aparato de fermentación continua de tipo de separación por membrana se convirtió en 2 l, con lo que se produjo ácido itacónico mediante fermentación continua. En este ensayo de fermentación continua, la cantidad de agua de permeación de la membrana se reguló y se cambió en las condiciones de control del agua de permeación de la membrana descritas anteriormente, durante lo cual la diferencia de carga hidrostática se midió como diferencia de presión transmembrana con un aparato de regulación de la diferencia de carga hidrostática 3. La concentración de ácido itacónico producido en el licor de fermentación de permeación de la membrana y la concentración de glucosa residual se midieron en un momento apropiado. La tasa de producción de ácido itacónico calculada a partir del ácido itacónico y la glucosa introducida calculada a partir de la concentración de glucosa se muestran en la tabla 16.

La producción estable de ácido itacónico mediante fermentación continua fue viable mediante el procedimiento de producción de un producto químico, según la presente invención, utilizando el aparato de fermentación continua de tipo de separación por membrana en la figura 1. La diferencia de presión transmembrana fluctuaba dentro de 2 kPa en el periodo completo de fermentación continua.

Ejemplo 22. Producción de ácido itacónico mediante fermentación continua (No. 2)

La producción de ácido itacónico se llevó a cabo utilizando el aparato de fermentación continua en la figura 2. El medio que tenía la composición mostrada en la tabla 15 se utilizó después de esterilización por vapor a alta presión (121 °C, 15 minutos). Como el material del elemento de membrana de separación, se utilizó un molde de acero inoxidable y resina de polisulfona. Como la membrana de separación, se utilizó la membrana porosa preparada en el ejemplo de referencia 2. A menos que se indique lo contrario, las condiciones operativas en este ejemplo son las siguientes:

Capacidad del tanque de reacción de fermentación: 2 l)
Membrana de separación utilizada: membrana de filtración de PVDF
Área de filtración eficaz del elemento de separación por membrana: 120 cm²
Control de la temperatura: 35 (°C)
Aireación del tanque de reacción de fermentación: 1,5 (l/min)
Velocidad de agitación del tanque de reacción de fermentación: 200 (rpm)
Esterilización: el tanque de cultivo que incluía el elemento de membrana de separación, y el medio utilizado, se esterilizaron con vapor a alta presión en un autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

Ajuste del pH: ajustado a pH 5 con NaOH 4 N
Regulación de la cantidad de agua de permeación de la membrana: regulación del caudal mediante diferencia de presión transmembrana
(Desde el inicio de la fermentación continua hasta 100 horas: regulado a de 0,1 kPa o más a 5 kPa o menos, de 100 horas a 200 horas: regulado a de 0,1 kPa o más a 2 kPa o menos, y de 200 horas a 300 horas: regulado a de 0,1 kPa o más a 20 kPa o menos)

La cepa ATCC10020 de *Aspergillus terreus* se utilizó como el microorganismo, un medio de fermentación de ácido itacónico que tenía la composición mostrada en la tabla 11 se utilizó como el medio, la concentración de ácido itacónico como un producto se midió mediante el procedimiento mostrado en el ejemplo 17. La concentración de glucosa se midió con el ensayo Glucose Test Wako C (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.).

En primer lugar, la cepa ATCC10020 de *Aspergillus terreus* se cultivó con agitación durante una noche en 5 ml de un medio de precultivo mostrado en la tabla 15 en un tubo de ensayo (antes del precultivo preliminar). El cultivo resultante se inoculó en 100 ml de un medio de precultivo fresco y se cultivó con agitación durante 48 horas a 35 °C en un matraz Sakaguchi de 500 ml (precultivo preliminar). El precultivo preliminar se inoculó en 1,5 l de un medio de fermentación continua/discontinua en el aparato de fermentación continua de tipo de separación por membrana mostrado en la figura 2, un tanque de reacción de fermentación 1 se agitó a 200 rpm con un agitador 5 unido a él, seguido por la regulación de la aireación y el control de la temperatura del tanque de reacción de fermentación 1, mientras el microorganismo se cultivó durante 24 horas (precultivo). Inmediatamente después de que terminó el precultivo, el microorganismo se cultivó de forma continua mientras un medio de fermentación continua/discontinua se alimentó de forma continua, y la cantidad de agua de permeación de la membrana se reguló de modo que la cantidad del licor de fermentación en el aparato de fermentación continua se convirtió en 1,5 l, con lo que se produjo ácido itacónico mediante fermentación continua. En este ensayo de fermentación continua, la cantidad de agua de permeación de la membrana se reguló y se cambió en las condiciones de control del agua de permeación de la membrana descritas anteriormente, durante lo cual la diferencia de carga hidrostática se midió como diferencia de presión transmembrana con un aparato de regulación de la diferencia de carga hidrostática 3. La concentración de ácido itacónico producido en el licor de fermentación de permeación de la membrana y la concentración de glucosa residual se midieron en un momento apropiado. La tasa de producción de ácido itacónico calculada a partir del ácido itacónico y la glucosa introducida calculada a partir de la concentración de glucosa se muestran en la tabla 16.

La producción estable de ácido itacónico mediante fermentación continua fue viable mediante el procedimiento de producción de un producto químico, según la presente invención, utilizando el aparato de fermentación continua en la figura 2. La diferencia de presión transmembrana fluctuaba dentro de 2 kPa en el periodo completo de fermentación continua.

Ejemplo comparativo 11. Producción de ácido itacónico mediante fermentación discontinua

Como una forma de fermentación utilizando un microorganismo, se llevó a cabo la fermentación discontinua más típica en un fermentador de jarra de 2 l para evaluar su productividad de ácido itacónico. El medio mostrado en la tabla 15 se utilizó después de esterilización por vapor a alta presión (121 °C, 15 minutos). En el ejemplo comparativo 11, la cepa ATCC10020 de *Aspergillus terreus* se utilizó como el microorganismo, la concentración de ácido itacónico como un producto se evaluó mediante el procedimiento mostrado en el ejemplo 17, y la concentración de glucosa se midió con el ensayo Glucose Test Wako C (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). Las condiciones operativas en el ejemplo comparativo 11 son las siguientes:

Capacidad del tanque de reacción de fermentación (cantidad de medio de fermentación de ácido itacónico): 1,5 (l)
Control de la temperatura: 35 (°C)
Aireación del tanque de reacción de fermentación: 1,5 (l/min)
Velocidad de agitación del tanque de reacción de fermentación: 200 (rpm)
Ajuste del pH: ajustado a pH 5 con NaOH 4 N

En primer lugar, la cepa ATCC10020 se cultivó con agitación durante una noche en 5 ml del medio de precultivo mostrado en la tabla 1 en un tubo de ensayo (precultivo preliminar). El precultivo preliminar se inoculó en 50 ml de un medio de precultivo fresco y se cultivó con agitación durante 48 horas en un matraz Sakaguchi de 500 ml (precultivo). El precultivo se inoculó en 1,5 l del medio de fermentación continua/discontinua mostrado en la tabla 15 en un fermentador de jarra y se sometió a fermentación discontinua. Los resultados de la fermentación discontinua se muestran en la tabla 16.

[Tabla 16]

	Ejemplo comparativo 11	Ejemplo 21	Ejemplo 22
Tiempo de fermentación (h)	80	300	300
Glucosa introducida (g)	105	2.090	1.650
Ácido itacónico formado (g)	55	1.020	790
Glucosa no utilizada (g)	1	50	50
Rendimiento (g/g)	0,53	0,50	0,49
Tasa de producción (g/l/h)	0,46	1,7	1,7

La tasa de producción de ácido itacónico mejoró significativamente mediante el procedimiento de producción de un producto químico según la presente invención utilizando los aparatos de fermentación mostrados en las figuras 1 y 2.

Ejemplo 23. Producción de cadaverina mediante fermentación continua (No. 1)

La producción de cadaverina se llevó a cabo utilizando el aparato de fermentación continua de tipo de separación por membrana en la figura 1 y un medio de fermentación de cadaverina con la composición mostrada en la tabla 17.

En primer lugar, se describe un procedimiento de evaluación de cadaverina como un producto. La cadaverina se evaluó mediante el siguiente procedimiento de HPLC.

Columna utilizada: CAPCELL PAK C18 (Shiseido Co., Ltd.)

Fase móvil: ácido fosfórico acuoso al 0,1 % (p/p):acetonitrilo = 4,5:5,5

Detección: UV 360 nm

Pretratamiento de la muestra: 25 µl de 1,4-diaminobutano (0,03 M) como un estándar interno, 150 µl de bicarbonato de sodio y una solución de etanol de 2,4-dinitrofluorobenceno (0,2 M) se añadieron a 25 µl de muestra de análisis y se mezclaron con los mismos, y la mezcla se mantuvo a una temperatura de 37 °C durante 1 hora. 50 µl de la solución de reacción se disolvieron en 1 ml de acetonitrilo y, a continuación, se centrifugaron a 10.000 rpm durante 5 minutos, y 10 µl del sobrenadante resultante se analizaron mediante HPLC.

El medio se utilizó después de esterilización por vapor a alta presión (121 °C, 15 minutos). Como el material del elemento de membrana de separación, se utilizó un moldeado de acero inoxidable y resina de polisulfona. Como la membrana de separación, se utilizó la membrana porosa preparada en el ejemplo de referencia 2. A menos que se indique lo contrario, las condiciones operativas en este ejemplo son las siguientes:

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

Membrana de separación utilizada: membrana de filtración de fluoruro de polivinilideno

Área de filtración eficaz del elemento de separación por membrana: 120 cm²

Control de la temperatura: 30 (°C)

Aireación del tanque de reacción de fermentación: 1,5 (l/min) aire

Velocidad de agitación del tanque de reacción de fermentación: 800 (rpm)

5 Ajuste del pH: ajustado a pH 7,0 con HCl 3 M y agua amoniacal 3 M

Esterilización: el tanque de cultivo que incluía el elemento de separación por membrana, y el medio utilizado, se esterilizaron con vapor a alta presión en un autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

Regulación de la cantidad de agua de permeación de la membrana: regulación del caudal mediante diferencia de presión transmembrana

10

(Desde el inicio de la fermentación continua hasta 100 horas: regulado a de 0,1 kPa o más a 5 kPa o menos, de 100 horas a 200 horas: regulado a de 0,1 kPa o más a 2 kPa o menos, y de 200 horas a 320 horas: regulado a de 0,1 kPa o más a 20 kPa o menos)

15 La TR-CAD1 de *Corynebacterium glutamicum* descrita en el documento JP-A No. 2004-222569 se utilizó como el microorganismo que producía cadaverina, y un medio de producción de cadaverina que tenía la composición mostrada en la tabla 17 se utilizó como el medio. La concentración de cadaverina como un producto se midió mediante el procedimiento de HPLC. La concentración de glucosa se midió con el ensayo Glucose Test Wako C (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.).

20

[Tabla 17]

Medio de fermentación de cadaverina

Glucosa	150 g/l
Ácido cítrico	1 g/l
Urea	15 g/l
Dihidrogenofosfato de potasio	0,5 g/l
Dihidrogenofosfato de dipotasio	0,5 g/l
Sulfato de magnesio · 7H ₂ O	0,5 g/l
L-Treonina	0,8 g/l
L-Metionina	0,6 g/l
L-Leucina	1,5 g/l
Sulfato de hierro · 7H ₂ O	6,0 mg/l
Monohidrato de manganeso	4,2 mg/l
Biotina	1,0 mg/l
Tiamina ajustado a pH 7,0 con agua amoniacal 3 M	2,0 mg/l

En primer lugar, la cepa TR-CAD1 de *Corynebacterium glutamicum* se cultivó con agitación durante una noche en 5 ml de un medio de fermentación de cadaverina que contenía kanamicina (25 µg/ml) en un tubo de ensayo (antes del precultivo preliminar). El cultivo resultante se inoculó en 50 ml de un medio fresco de producción de cadaverina que contenía kanamicina (25 µg/ml) añadida y se cultivó durante 24 horas a una temperatura de 30 °C a 180 rpm con una amplitud de 30 cm en un matraz Sakaguchi de 500 ml (precultivo preliminar). El precultivo preliminar se inoculó en 2,0 l de un medio de fermentación de cadaverina en el aparato de fermentación continua de tipo de separación por membrana mostrado en la figura 1, un tanque de reacción de fermentación 1 se agitó a 800 rpm con un agitador 5 unido a él, seguido por la regulación de la aireación, control de la temperatura y ajuste del pH del tanque de reacción de fermentación 1, mientras el microorganismo se cultivó durante 24 horas (precultivo).

Inmediatamente después de que terminó el precultivo, se hizo funcionar la bomba de circulación de licor de fermentación 10, y el microorganismo se cultivó de forma continua en las condiciones en las que, además de las condiciones operativas en el momento del precultivo, se aireó un tanque de separación por membrana 2, un medio de fermentación de cadaverina se alimentó de forma continua, y la cantidad de agua de permeación de la membrana se reguló de modo que la cantidad del licor de fermentación en el aparato de fermentación continua se convirtió en 2 l, con lo que se produjo cadaverina mediante fermentación continua. En este ensayo de fermentación continua, la cantidad de agua de permeación de la membrana se reguló y se cambió en las condiciones de control del agua de permeación de la membrana descritas anteriormente, durante lo cual la diferencia de carga hidrostática se midió como diferencia de presión transmembrana con un aparato de regulación de la diferencia de carga hidrostática 3. La concentración de ácido láctico producido en el licor de fermentación de permeación de la membrana y la concentración de glucosa residual se midieron en un momento apropiado.

45 Los resultados en el ensayo de fermentación continua durante 160 horas se muestran en la tabla 18. La producción estable de cadaverina mediante fermentación continua fue viable mediante el procedimiento de producción de un

producto químico, según la presente invención, utilizando el aparato de fermentación continua de tipo de separación por membrana en la figura 1. La diferencia de presión transmembrana fluctuaba dentro de 2 kPa en el periodo completo de fermentación continua.

5 Ejemplo 24. Producción de cadaverina mediante fermentación continua (No. 2)

La producción de cadaverina se llevó a cabo utilizando el aparato de fermentación continua en la figura 2 y un medio de fermentación de cadaverina con la composición mostrada en la tabla 17. El medio se utilizó después de esterilización por vapor a alta presión (121 °C, 15 minutos). Como el material del elemento de membrana de separación, se utilizó un moldeo de acero inoxidable y resina de polisulfona. Como la membrana de separación, se utilizó la membrana porosa preparada en el ejemplo de referencia 2. A menos que se indique lo contrario, las condiciones operativas en este ejemplo son las siguientes:

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

Membrana de separación utilizada: membrana de filtración de fluoruro de polivinilideno

Área de filtración eficaz del elemento de separación por membrana: 120 cm²

Control de la temperatura: 30 (°C)

Aireación del tanque de reacción de fermentación: 1,5 (l/min) aire

Velocidad de agitación del tanque de reacción de fermentación: 800 (rpm)

Ajuste del pH: ajustado a pH 7,0 con HCl 3 M y agua amoniacal 3 M

Esterilización: el tanque de cultivo que incluía el elemento de membrana de separación, y el medio utilizado, se esterilizaron con vapor a alta presión en un autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

Regulación de la cantidad de agua de permeación de la membrana: regulación del caudal mediante diferencia de presión transmembrana

(Desde el inicio de la fermentación continua hasta 100 horas: regulado a de 0,1 kPa o más a 5 kPa o menos, de 100 horas a 200 horas: regulado a de 0,1 kPa o más a 2 kPa o menos, y de 200 horas a 264 horas: regulado a de 0,1 kPa o más a 20 kPa o menos)

La cepa TR-CAD1 de *Corynebacterium glutamicum* se utilizó como el microorganismo, un medio de fermentación de cadaverina que tenía la composición mostrada en la tabla 17 se utilizó como el medio, y la concentración de cadaverina como un producto se midió mediante el procedimiento de HPLC. La concentración de glucosa se midió con el ensayo Glucose Test Wako C (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.).

En primer lugar, la cepa TR-CAD1 de *Corynebacterium glutamicum* se cultivó con agitación durante una noche en 5 ml de un medio de producción de cadaverina que contenía kanamicina (25 µg/ml) añadida en un tubo de ensayo (antes del precultivo preliminar). El cultivo resultante se inoculó en 50 ml de un medio fresco de producción de cadaverina que contenía kanamicina (25 µg/ml) añadida y se cultivó durante 24 horas a una temperatura de 30 °C a 180 rpm con una amplitud de 30 cm en un matraz Sakaguchi de 500 ml (precultivo preliminar).

El precultivo preliminar se inoculó en 1,5 l de un medio de producción de cadaverina en el aparato de fermentación continua de tipo de separación por membrana mostrado en la figura 2, un tanque de reacción de fermentación 1 se agitó a 800 rpm con un agitador 5 unido a él, seguido por la regulación de la aireación, control de la temperatura y ajuste del pH del tanque de reacción de fermentación 1, mientras el microorganismo se cultivó durante 24 horas (precultivo). Inmediatamente después de que terminó el precultivo, el microorganismo se cultivó de forma continua mientras un medio de fermentación de cadaverina se alimentó de forma continua, y la cantidad de agua de permeación de la membrana se reguló de modo que la cantidad del licor de fermentación en el aparato de fermentación continua se convirtió en 1,5 l, con lo que se produjo cadaverina mediante fermentación continua. La regulación de la cantidad de agua de permeación de la membrana en el ensayo de fermentación continua se llevó a cabo cambiando apropiadamente la diferencia de carga hidrostática con un aparato de regulación de la diferencia de carga hidrostática 3 de modo que la diferencia de carga hidrostática del tanque de reacción de fermentación estaba dentro de 2 m, es decir, la diferencia de presión transmembrana estaba dentro de 20 kPa. La concentración de cadaverina producido en el licor de fermentación de permeación de la membrana y la concentración de glucosa residual se midieron en un momento apropiado. La tasa de producción de cadaverina calculada a partir de la cadaverina y la glucosa introducida se muestra en la tabla 18.

Los resultados en el ensayo de fermentación continua durante 320 horas se muestran en la tabla 18. La producción estable de cadaverina mediante fermentación continua fue viable mediante el procedimiento de producción de un producto químico, según la presente invención, utilizando el aparato de fermentación continua en la figura 2. La diferencia de presión transmembrana fluctuaba dentro de 2 kPa en el periodo completo de fermentación continua.

Ejemplo comparativo 12. Producción de cadaverina mediante fermentación discontinua

Como una forma de fermentación utilizando un microorganismo, se llevó a cabo la fermentación discontinua más típica en un fermentador de jarra de 2 l para evaluar su productividad de cadaverina. El medio se utilizó después de esterilización por vapor a alta presión (121 °C, 15 minutos). En este ejemplo comparativo, la cepa TR-CAD1 de

Corynebacterium glutamicum se utilizó como el microorganismo, la concentración de cadaverina como un producto se evaluó mediante el procedimiento de HPLC, y la concentración de glucosa se midió con el ensayo Glucose Test Wako C (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). Las condiciones operativas en el ejemplo comparativo 8 son las siguientes:

Capacidad del tanque de reacción de fermentación (cantidad de medio de producción de cadaverina): 1,0 (l)
Control de la temperatura: 35 (°C)
Aireación del tanque de reacción de fermentación: 1,5 (l/min) aire
Velocidad de agitación del tanque de reacción de fermentación: 800 (rpm)
Ajuste del pH: ajustado a pH 7,0 con HCl 3 M y agua amoniacal 3 M

En primer lugar, la cepa TR-CAD1 de *Corynebacterium glutamicum* se cultivó con agitación durante una noche en 5 ml de un medio de producción de cadaverina que contenía kanamicina (25 µg/ml) añadida en un tubo de ensayo (precultivo preliminar). El cultivo resultante se inoculó en 50 ml de un medio fresco de producción de cadaverina que contenía kanamicina (25 µg/ml) añadida y se cultivó durante 24 horas a una temperatura de 30 °C a 180 rpm con una amplitud de 30 cm en un matraz Sakaguchi de 500 ml (precultivo).

El precultivo se inoculó en 1,0 l de un medio de producción de cadaverina (concentración de glucosa: 100 g/l) en un fermentador de jarra. El microorganismo se sometió a fermentación discontinua con el medio de producción de cadaverina. Los resultados se muestran en la tabla 18.

[Tabla 18]

	Ejemplo comparativo 12	Ejemplo 23	Ejemplo 24
Tiempo de fermentación (h)	30	160	144
Glucosa introducida (g)	100	2.460	2.210
Cadaverina producida (g)	2,6	60,4	56,2
Glucosa no utilizada (g)	0	45	50
Rendimiento de cadaverina (g/g)	2,6	2,5	2,5
Tasa de producción de cadaverina (g/l/h)	0,087	0,200	0,260

Se pudo revelar que la tasa de producción de cadaverina mejoró significativamente mediante el procedimiento de producción de un producto químico según la presente invención utilizando los aparatos de fermentación mostrados en las figuras 1 y 2.

Ejemplo 25. Producción de ácidos nucleicos mediante fermentación continua (No. 1)

La producción de ácidos nucleicos se llevó a cabo utilizando el aparato de fermentación continua de tipo de separación por membrana en la figura 1. El medio mostrado en la tabla 19 se utilizó después de esterilización por vapor a alta presión (121 °C, 15 minutos). Como el material del elemento de membrana de separación, se utilizó un moldeado de acero inoxidable y resina de polisulfona. Como la membrana de separación, se utilizó la membrana porosa preparada en el ejemplo de referencia 2. A menos que se indique lo contrario, las condiciones operativas en este ejemplo son las siguientes:

Capacidad del tanque de reacción de fermentación: 2 (l)
Membrana de separación utilizada: membrana de filtración de fluoruro de polivinilideno
Área de filtración eficaz del elemento de separación por membrana: 120 cm²
Control de la temperatura: 30 (°C)
Aireación del tanque de reacción de fermentación: 1.000 (ml/min)
Velocidad de agitación del tanque de reacción de fermentación: 800 (rpm)
Esterilización: el tanque de cultivo que incluía el elemento de membrana de separación, y el medio utilizado, se esterilizaron con vapor a alta presión en un autoclave a 121 °C durante 20 minutos.
Ajuste del pH: ajustado a pH 6,8 con amoníaco acuoso al 25 %
Regulación de la cantidad de agua de permeación de la membrana: regulación del caudal mediante diferencia de presión transmembrana
(Desde el inicio de la fermentación continua hasta 150 horas: regulado a de 0,1 kPa o más a 5 kPa o menos, de 150 horas a 300 horas: regulado a de 0,1 kPa o más a 2 kPa o menos, y de 300 horas a 400 horas: regulado a de 0,1 kPa o más a 20 kPa o menos)

Se utilizó *Corynebacterium ammoniagenes* ATCC21479 como el microorganismo procariota, y un medio de fermentación de ácidos nucleicos que tenía la composición mostrada en la tabla 19 se utilizó como el medio. La concentración de guanosina e inosina contenida en un licor de fermentación se confirmaron midiendo las cantidades de los ácidos nucleicos respectivos mediante HPLC en las siguientes condiciones:

(Condiciones de análisis)

Columna: Asahipak GS-220 (7,6 mm DI×500 mm L), tampón: NaH₂PO₄ 0,2 M (pH 3,98) con pH ajustado con ácido fosfórico, temperatura: 55 °C, caudal: 1,5 ml/min, detección: UV 254 nm, tiempo de retención (min): inosina 16,1, guanosina 20,5.

La concentración de glucosa se midió con el ensayo Glucose Test Wako C (marca registrada) (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.).

[Tabla 19]

Medio de fermentación de ácido nucleico

	Precultivo	Fermentación discontinua	Fermentación continua	
Glucosa	20	150	150	g/l
Dihidrogenofosfato de potasio		10	10	g/l
Hidrogenofosfato de potasio		10	10	g/l
Sulfato de magnesio		10	10	g/l
Cloruro de calcio		1	1	g/l
Sulfato de hierro		10	10	mg/l
Zinc sulfato		1	1	mg/l
Tiamina		5	5	mg/l
Pantotenato de calcio		10	10	mg/l
Cisteína		20	20	mg/l
Biotina		30	30	ug/l
Urea		2	2	g/l
Extracto de carne	10	10	10	g/l
Adenina		300	300	mg/l
Hipoxantina		100	100	mg/l
Peptona	10	10	1	g/l
Extracto de levadura	10	10	1	g/l
Cloruro de sodio	3	3	3	g/l

En primer lugar, *Corynebacterium ammoniagenes* ATCC21479 se cultivó con agitación en 150 ml del medio de precultivo mostrado en la tabla 15 durante 24 horas a una temperatura de 30 °C en un matraz Sakaguchi (precultivo preliminar). El precultivo preliminar se inoculó en 1 l de un medio de precultivo en el aparato de fermentación continua de tipo de separación por membrana mostrado en la figura 1, un tanque de reacción de fermentación 1 se agitó a 800 rpm con un agitador 5 unido a él, seguido por la regulación de la aireación y el control de la temperatura a 30 °C del tanque de reacción 1, mientras el microorganismo se cultivó durante 24 horas (precultivo). Inmediatamente después de que terminó el precultivo, se hizo funcionar la bomba de circulación de líquido de fermentación, y el microorganismo se cultivó de forma continua en las condiciones en las que, además de las condiciones operativas en el momento del precultivo, el tanque de separación por membrana 2 se aireó, el medio de fermentación continua se alimentó de forma continua, y después de que el precultivo terminó, el medio de fermentación continua se alimentó de forma continua, y el medio de fermentación se hizo circular entre el tanque de reacción de fermentación 1 y el tanque de separación por membrana 12 mediante la bomba de circulación de licor de fermentación 11, y la cantidad de agua de permeación de la membrana se reguló de modo que la cantidad del licor de fermentación en el aparato de fermentación continua de tipo de separación por membrana se convirtió en 2 l, con lo que se produjeron ácidos nucleicos mediante fermentación continua. En este ensayo de fermentación continua, la cantidad de agua de permeación de la membrana se reguló y se cambió en las condiciones de control del agua de permeación de la membrana descritas anteriormente, durante lo cual la diferencia de carga hidrostática se midió como diferencia de presión transmembrana con un aparato de regulación de la diferencia de carga hidrostática 3. La concentración de ácidos nucleicos producido en el licor de fermentación de permeación de la membrana y la concentración de glucosa residual se midieron en un momento apropiado. La tasa de producción de ácidos nucleicos calculada a partir de ácido nucleico y la glucosa introducida calculada a partir de la concentración de glucosa se muestran en la tabla 20.

Como resultado del ensayo de fermentación durante 400 horas, la producción estable de ácidos nucleicos mediante fermentación continua fue viable mediante el procedimiento de producción de un producto químico, según la presente invención, utilizando el aparato de fermentación continua en la figura 1. La diferencia de presión transmembrana fluctuaba dentro de 2 kPa en el periodo completo de fermentación continua.

Ejemplo 26. Producción de ácidos nucleicos mediante fermentación continua (No. 2)

La producción de ácidos nucleicos se llevó a cabo utilizando el aparato de fermentación continua en la figura 2. El medio mostrado en la tabla 19 se utilizó después de esterilización por vapor a alta presión (121 °C, 15 minutos). Como el material del elemento de membrana de separación, se utilizó un moldeo de acero inoxidable y resina de polisulfona. Como la membrana de separación, se utilizó la membrana porosa preparada en el ejemplo de referencia 2. A menos que se indique lo contrario, las condiciones operativas en este ejemplo son las siguientes:

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

Membrana de separación utilizada: membrana de filtración de fluoruro de polivinilideno

Área de filtración eficaz del elemento de separación por membrana: 120 cm²

Control de la temperatura: 30 (°C)

Aireación del tanque de reacción de fermentación: 1000 (ml/min)

Velocidad de agitación del tanque de reacción de fermentación: 800 (rpm)

Esterilización: el tanque de cultivo que incluía el elemento de membrana de separación, y el medio utilizado, se esterilizaron con vapor a alta presión en un autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

Ajuste del pH: ajustado a pH 6,8 con amoníaco acuoso al 25 %

Regulación de la cantidad de agua de permeación de la membrana: regulación del caudal mediante diferencia de presión transmembrana

(Desde el inicio de la fermentación continua hasta 150 horas: regulado a de 0,1 kPa o más a 5 kPa o menos,

de 150 horas a 300 horas: regulado a de 0,1 kPa o más a 2 kPa o menos, y

de 300 horas a 400 horas: regulado a de 0,1 kPa o más a 20 kPa o menos)

Se utilizó *Corynebacterium ammoniagenes* ATCC21479 como el microorganismo procariota, y un medio de fermentación de ácido nucleico que tenía la composición mostrada en la tabla 19 se utilizó como el medio. La concentración de guanosina, inosina y glucosa contenida en un licor de fermentación se confirmaron midiendo las cantidades de los ácidos nucleicos respectivos de la misma manera que en el ejemplo 1.

En primer lugar, *Corynebacterium ammoniagenes* ATCC21479 se cultivó con agitación durante 24 horas a una temperatura de 30 °C en 150 ml de un medio de precultivo mostrado en la tabla 19 en un matraz Sakaguchi (precultivo preliminar). El precultivo preliminar se inoculó en 1 l de un medio de precultivo en el aparato de fermentación continua de tipo de separación por membrana mostrado en la figura 2, un tanque de reacción de fermentación 1 se agitó a 800 rpm con un agitador 5 unido a él, seguido por la regulación de la aireación y el control de la temperatura a 30 °C del tanque de reacción 1, mientras el microorganismo se cultivó durante 24 horas (precultivo). Inmediatamente después de que terminó el precultivo, el medio de fermentación continua se alimentó de forma continua, y el microorganismo se cultivó de forma continua mientras la cantidad de agua de permeación de la membrana se reguló de modo que la cantidad del licor de fermentación en el aparato de fermentación continua se convirtió en 1,5 l, con lo que se produjeron ácidos nucleicos mediante fermentación continua. En este ensayo de fermentación continua, la cantidad de agua de permeación de la membrana se reguló y se cambió en las condiciones de control del agua de permeación de la membrana descritas anteriormente, durante lo cual la diferencia de carga hidrostática se midió como diferencia de presión transmembrana con un aparato de regulación de la diferencia de carga hidrostática 3. La concentración de ácidos nucleicos producido en el licor de fermentación de permeación de la membrana y la concentración de glucosa residual se midieron en un momento apropiado. La tasa de producción de ácidos nucleicos calculada a partir de ácido nucleico y la glucosa introducida calculada a partir de la concentración de glucosa se muestran en la tabla 20.

Como resultado del ensayo de fermentación durante 400 horas, la producción estable de ácidos nucleicos mediante fermentación continua fue viable mediante el procedimiento de producción de un producto químico, según la presente invención, utilizando el aparato de fermentación continua en la figura 2. La diferencia de presión transmembrana fluctuaba dentro de 2 kPa en el periodo completo de fermentación continua.

Ejemplo comparativo 13. Producción de ácidos nucleicos mediante fermentación discontinua

Como una forma de fermentación utilizando un microorganismo, se llevó a cabo la fermentación discontinua más típica en un fermentador de jarra de 2 l para evaluar su productividad de ácido nucleico. El medio de fermentación continua mostrado en la tabla 19 se utilizó después de esterilización por vapor a alta presión (121 °C, 15 minutos). En este ejemplo comparativo, *Corynebacterium ammoniagenes* ATCC21479 se utilizó como el microorganismo procariota, la concentración de ácidos nucleicos como el producto se evaluó mediante el procedimiento mostrado en el ejemplo 21, y la concentración de glucosa se midió con el ensayo Glucose Test Wako C (marca registrada) (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). Las condiciones operativas en este ejemplo comparativo son las siguientes:

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

Control de la temperatura: 30 (°C)

Aireación del tanque de reacción de fermentación: 1.000 (ml/min)

Velocidad de agitación del tanque de reacción de fermentación: 800 (rpm)

Esterilización: el tanque de cultivo que incluía el elemento de membrana de separación, y el medio utilizado, se esterilizaron con vapor a alta presión en un autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

Ajuste del pH: ajustado a pH 6,8 con amoníaco acuoso al 25 %

- 5 En primer lugar, *Corynebacterium ammoniagenes* ATCC21479 se cultivó con agitación durante 24 horas a una temperatura de 30 °C en 150 ml del medio de precultivo mostrado en la tabla 19 en un matraz Sakaguchi (precultivo). El precultivo resultante se inoculó en 1 l del medio de fermentación continua mostrado en la tabla 19 en un fermentador de jarra y se sometió a fermentación discontinua. Después de que la fermentación se inició, se añadió glucosa al 5 % de modo que la fermentación continuó. Los resultados de la fermentación discontinua durante

10 120 horas se muestran en la tabla 20.

[Tabla 20]

		Ejemplo comparativo 13	Ejemplo 25	Ejemplo 26
Tiempo de fermentación	(h)	120	400	400
Glucosa introducida	(g)	200	4.530	4.690
Ácido nucleico formado				
Inosina Guanosina	(g)	50 2	906 23	878 23
Glucosa no utilizada	(g)	0	80	70
Rendimiento				
Inosina Guanosina	(g/g)	0,25 0,01	0,20 0,005	0,19 0,005
Tasa de producción (Inosina + guanosina)	(g/l/h)	0,47	2,3	2,3

- 15 Se pudo revelar que la tasa de producción de ácidos nucleicos mejoró significativamente mediante el procedimiento de producción de un producto químico, según la presente invención, utilizando el aparato de fermentación mostrado en las figuras 1 y 2.

Ejemplo 27. Producción de L-treonina mediante fermentación continua (No. 1)

- 20 La producción de L-treonina se llevó a cabo utilizando el aparato de fermentación continua de tipo de separación por membrana en la figura 1 y un medio de fermentación con la composición mostrada en la tabla 21.

- 25 En primer lugar, se describe un procedimiento de evaluación de L-treonina como un producto. La cantidad de L-treonina contenida en un cultivo se midió mediante el siguiente procedimiento. Se retiraron 25 µl de un cultivo que contenía L-treonina a medir y a continuación se les añadieron 150 µl de NaHCO₃ (75 mM) y 25 µl de estándar interno L-metionina (2 g/l). Además, 900 µl de etanol y 150 µl de DNFB (0,2 M) se añadieron a la solución anterior y se mezclaron con la misma. La solución resultante se dejó a 37 °C durante 1 hora y se analizó mediante HPLC en las siguientes condiciones:

- 30 Columna utilizada: CAPCELLPAK C18 TIPO SG120 (Shiseido Co., Ltd.)

Fase móvil: H₃PO₄ al 0,1 % (p/v):acetonitrilo = 7:3 (caudal 1,2 ml/min)

Detección: UV (360 nm)

Temperatura: 23 °C

- 35 Se preparó una curva de calibración analizando muestras de L-treonina de concentración conocida como una muestra y representando gráficamente sus concentraciones de L-treonina en la abscisa y la relación de área (relación de área de L-treonina/área de L-metionina (estándar interno)) en la ordenada. El medio se utilizó después de esterilización por vapor a alta presión (121 °C, 15 minutos). Como la membrana de separación, se utilizó la membrana porosa preparada en el ejemplo de referencia 2.

40

A menos que se indique lo contrario, las condiciones operativas en este ejemplo son las siguientes:

Capacidad del tanque de reacción: 2 (l)

Capacidad del tanque de separación por membrana: 0,5 (l)

- 45 Membrana de separación utilizada: membrana de filtración de fluoruro de polivinilideno

Área de filtración eficaz del elemento de separación por membrana: 60 cm²

Control de la temperatura: 37 (°C)

Aireación del tanque de reacción: 1,5 (l/min)

Aireación del tanque de separación por membrana: 1 (l/min)

- 50 Velocidad de agitación del tanque de reacción: 800 (rpm)

Ajuste del pH: ajustado a pH 7 con amoníaco acuoso al 28 %

Velocidad de alimentación de medio de fermentación de L-treonina: control variable en el intervalo de 50 a 300 ml/h.

Regulación de la cantidad de agua de permeación de la membrana: regulación del caudal mediante diferencia de presión transmembrana

- 55 (Desde el inicio de la fermentación continua hasta 100 horas: regulado a de 0,1 kPa o más a 5 kPa o menos y de 100 horas a 200 horas: regulado a de 0,1 kPa o más a 2 kPa o menos)

En *Providencia rettgeri*, *Providencia rettgeri* SGR588-77 (FERMP-10528) se utilizó como el microorganismo que produce L-treonina, un medio de fermentación que tenía la composición mostrada en la tabla 21 se utilizó como el medio, la concentración de L-treonina como un producto se midió mediante el procedimiento de HPLC descrito anteriormente, y la concentración de glucosa se midió con el ensayo Glucose Test Wako C (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.).

[Tabla 21]
Medio de fermentación de L-treonina

Componentes del medio		Medio de fermentación	Medio de precultivo	Medio adicional de medio discontinuo
Glucosa	g/l	120	50	750
Sulfato de amonio	g/l	5	5	-
Dihidrogenofosfato de potasio	g/l	1	1	5
Sulfato de magnesio · 7H ₂ O	g/l	0,4	0,4	2
Sulfato de hierro · 7H ₂ O	ppm	2	2	-
Sulfato de magnesio · 5H ₂ O	ppm	2	2	-
L-Isoleucina	mg/l	10	50	200

En primer lugar, *Providencia rettgeri* SGR588-77 raspado de un medio de agar se inoculó en 100 ml de un medio de caldo de glucosa (1 % de glucosa, 3 % de caldo (fabricado por Nissui Co., Ltd.)) en un matraz Erlenmeyer de 500 ml y se cultivaron a 37 °C con agitación a 140 rpm (precultivo preliminar). El precultivo preliminar se inoculó en 1,5 l de un medio de precultivo (tabla 21) en el aparato de fermentación continua de tipo de separación por membrana mostrado en la figura 1, un tanque de reacción 1 se agitó a 800 rpm con un agitador 5 unido a él, seguido por la regulación de la aireación y el control de la temperatura a 37 °C del tanque de reacción 1, mientras el microorganismo se cultivó durante 24 horas (precultivo). Inmediatamente después de que terminó el precultivo, se hizo funcionar la bomba de circulación de licor de fermentación, y el microorganismo se cultivó en condiciones en las que, además de las condiciones operativas en el momento del precultivo, el tanque de separación por membrana 2 se aireó, y un medio de fermentación que tenía la composición mostrada en la tabla 17 se alimentó de forma continua, y la cantidad de agua de permeación de la membrana se reguló de modo que la cantidad del licor de fermentación en el aparato de fermentación continua se convirtió en 2 l, con lo que se produjo L-treonina mediante fermentación continua. En este ensayo de fermentación continua, la cantidad de agua de permeación de la membrana se reguló y se cambió en las condiciones de control del agua de permeación de la membrana descritas anteriormente, durante lo cual la diferencia de carga hidrostática se midió como diferencia de presión transmembrana con un aparato de regulación de la diferencia de carga hidrostática 3. La concentración de L-treonina producido en el licor de fermentación de permeación de la membrana y la concentración de glucosa residual se midieron en un momento apropiado. La diferencia de carga hidrostática se cambió apropiadamente, de modo que la carga hidrostática del tanque de reacción de fermentación fue de 2 m o menos, como máximo, es decir, la diferencia de presión transmembrana estaba dentro de 20 kPa. La concentración de L-treonina producida en el licor de fermentación de permeación de la membrana y la concentración de glucosa residual se midieron en un momento apropiado. Los resultados del ensayo de fermentación continua durante 200 horas se muestran en la tabla 22.

La producción estable de L-treonina mediante fermentación continua fue viable mediante el procedimiento de producción de un producto químico, según la presente invención, utilizando el aparato de fermentación continua de tipo de separación por membrana en la figura 1. La diferencia de presión transmembrana fluctuaba dentro de 2 kPa en el periodo completo de fermentación continua.

Ejemplo 28. Producción de L-treonina mediante fermentación continua (No. 2)

La producción de L-treonina se llevó a cabo utilizando el aparato de fermentación continua en la figura 2 y un medio de fermentación con la composición mostrada en la tabla 21. El medio se utilizó después de esterilización por vapor a alta presión (121 °C, 15 minutos). Como el material del elemento de membrana de separación, se utilizó un molde de acero inoxidable y resina de polisulfona. Como la membrana de separación, se utilizó la membrana porosa preparada en el ejemplo de referencia 2. A menos que se indique lo contrario, las condiciones operativas en este ejemplo son las siguientes:

Capacidad del tanque de reacción: 2 (l)

Membrana de separación utilizada: membrana de filtración de PVDF

Área de filtración eficaz del elemento de separación por membrana: 120 cm²

Control de la temperatura: 37 (°C)

Aireación del tanque de reacción: 1,5 (l/min)

Velocidad de agitación del tanque de reacción: 800 (rpm)

Ajuste del pH: ajustado a pH 7 con amoniaco acuoso al 25 %

Velocidad de alimentación de medio de fermentación de L-treonina: control variable en el intervalo de 50 a 300 ml/h.

Regulación de la cantidad de agua de permeación de la membrana: regulación del caudal mediante diferencia de presión transmembrana

- 5 (Desde el inicio de la fermentación continua hasta 100 horas: regulado a de 0,1 kPa o más a 5 kPa o menos y de 100 horas a 200 horas: regulado a de 0,1 kPa o más a 2 kPa o menos)

Esterilización: el tanque de cultivo que incluía el elemento de membrana de separación, y el medio utilizado, se esterilizaron con vapor a alta presión en un autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

- 10 En *Providencia rettgeri*, *Providencia rettgeri* SGR588-77 (FERMP-10528) se utilizó como el microorganismo que produce L-treonina, un medio de fermentación que tenía la composición mostrada en la tabla 21 se utilizó como el medio, la concentración de L-treonina como un producto se midió mediante HPLC mostrada en el ejemplo 23, y la concentración de glucosa se midió con el ensayo Glucose Test Wako C (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.).

- 15 En primer lugar, *Providencia rettgeri* SGR588-77 raspado de un medio de agar se inoculó en 100 ml de un medio de caldo de glucosa (1 % de glucosa, 3 % de caldo (fabricado por Nissui Co., Ltd.)) en un matraz Erlenmeyer de 500 ml. El microorganismo se cultivó a 37 °C con agitación a 140 rpm (precultivo preliminar). El precultivo preliminar se inoculó en 1,5 l de un medio de precultivo (tabla 21) en el aparato de fermentación continua mostrado en la figura 1, un tanque de reacción 1 se agitó a 800 rpm con un agitador 5 unido a él, seguido por la regulación de la aireación, control de la temperatura y el ajuste del pH del tanque de reacción 1, mientras el microorganismo se cultivó durante 24 horas (precultivo). Inmediatamente después de que terminó el precultivo, el microorganismo se cultivó de forma continua mientras un medio de fermentación que tenía la composición mostrada en la tabla 21 se alimentó de forma continua, y la cantidad de agua de permeación de la membrana se reguló de modo que la cantidad del licor de fermentación en el aparato de fermentación continua se convirtió en 1,5 l, con lo que se produjo L-treonina mediante fermentación continua. En este ensayo de fermentación continua, la cantidad de agua de permeación de la membrana se reguló y se cambió en las condiciones de control del agua de permeación de la membrana descritas anteriormente, durante lo cual la diferencia de carga hidrostática se midió como diferencia de presión transmembrana con un aparato de regulación de la diferencia de carga hidrostática 3. La concentración de L-treonina producido en el licor de fermentación de permeación de la membrana y la concentración de glucosa residual se midieron en un momento apropiado. El rendimiento de L-treonina respecto a azúcar y la tasa de producción de ácido láctico basándose en la L-treonina y la glucosa introducida calculada a partir de la concentración de glucosa se muestran en la tabla 18.

- 35 Como resultado del ensayo de fermentación durante 200 horas, la producción estable de L-treonina mediante fermentación continua fue viable mediante el procedimiento de producción de un producto químico, según la presente invención, utilizando el aparato de fermentación continua en la figura 2. La diferencia de presión transmembrana fluctuaba dentro de 2 kPa en el periodo completo de fermentación continua.

Ejemplo comparativo 14. Producción de L-treonina mediante fermentación discontinua

- 40 Como una forma de fermentación utilizando un microorganismo, se llevó a cabo la fermentación discontinua más típica en un fermentador de jarra de 2 l para evaluar su productividad de L-treonina. El medio de precultivo mostrado en la tabla 21 se utilizó como un medio cuando se inició el cultivo discontinuo. Estos medios se utilizaron después de esterilización por vapor a alta presión (121 °C, 15 minutos). En este ejemplo comparativo, *Providencia rettgeri* SGR588-77 se utilizó como el microorganismo, la concentración de L-treonina y glucosa contenida en el licor de fermentación se midieron mediante el procedimiento mostrado en el ejemplo 27. Las condiciones operativas en este ejemplo comparativo son las siguientes:

Capacidad del tanque de reacción de fermentación (cantidad de medio de fermentación de L-treonina): 1 (l)

- 50 Control de la temperatura: 37 (°C)

Aireación del tanque de reacción de fermentación: 1 (l/min)

Velocidad de agitación del tanque de reacción de fermentación: 800 (rpm)

Ajuste del pH: ajustado a pH 7 con amoniaco acuoso al 28 %

- 55 En primer lugar, *Providencia rettgeri* SGR588-77 raspado de un medio de agar se inoculó en 90 ml de un medio de caldo de glucosa (1 % de glucosa, 3 % de caldo (fabricado por Nissui Co., Ltd.)) en un matraz Erlenmeyer de 500 ml. El microorganismo se cultivó a 37 °C con agitación a 140 rpm (precultivo). El precultivo se inoculó en 810 ml del medio de precultivo mostrado en la tabla 17 en un fermentador de mini-jarra y se sometió a fermentación discontinua. La composición de un medio añadido durante el cultivo se muestra en el medio adicional en la tabla 9.
- 60 El medio se añadió 24, 32, 40 y 48 horas después del inicio del cultivo en una cantidad de 50 ml, respectivamente. Los resultados de la fermentación discontinua se muestran en la tabla 22.

[Tabla 22]

	Ejemplo comparativo 14	Ejemplo 27	Ejemplo 28
Tiempo de fermentación (h)	55	200	200
Glucosa introducida (g)	195	2.350	2.290
L-treonina formada (g)	67,3	766	727
Glucosa no utilizada (g)	0	98	87
Rendimiento (g/g)	0,345	0,34	0,33
Tasa de producción (g/l/h)	1,11	1,9	2,5

Se pudo revelar que la tasa de producción de L-treonina mejoró significativamente mediante el procedimiento de producción de un producto químico, según la presente invención, utilizando el aparato de fermentación mostrado en las figuras 1 y 2.

Ejemplo 29. Producción de ácido L-láctico mediante fermentación continua utilizando una bacteria del ácido láctico (No. 1)

La producción de ácido L-láctico se llevó a cabo utilizando el aparato de fermentación continua de tipo de separación por membrana en la figura 1. El medio de fermentación de ácido láctico de la bacteria del L-ácido láctico mostrado en la tabla 23 se utilizó después de esterilización por vapor a alta presión (121 °C, 15 minutos). Como la membrana de separación, se utilizó la membrana porosa preparada en el ejemplo de referencia 2. A menos que se indique lo contrario, las condiciones operativas en este ejemplo son las siguientes:

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

Membrana de separación utilizada: membrana de filtración de fluoruro de polivinilideno

Área de filtración eficaz del elemento de separación por membrana: 120 cm²

Control de la temperatura: 37 (°C)

Aireación del tanque de reacción de fermentación: 50 (ml/min) nitrógeno

Velocidad de agitación del tanque de reacción de fermentación: 600 (rpm)

Esterilización: el tanque de cultivo que incluía el elemento de membrana de separación, y el medio utilizado, se esterilizaron con vapor a alta presión en un autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

Ajuste del pH: ajustado a pH 6,5 con amoníaco acuoso 8 N

Regulación de la cantidad de agua de permeación de la membrana: regulación del caudal mediante diferencia de presión transmembrana

(Desde el inicio de la fermentación continua hasta 150 horas: regulado a de 0,1 kPa o más a 5 kPa o menos,

de 150 horas a 300 horas: regulado a de 0,1 kPa o más a 2 kPa o menos, y

de 300 horas a 400 horas: regulado a de 0,1 kPa o más a 20 kPa o menos)

La cepa JCM7638 de *Lactococcus lactis* se utilizó como el microorganismo procariota, y una bacteria del ácido láctico medio de fermentación de ácido láctico que tenía la composición mostrada en la tabla 23 se utilizó como el medio. La concentración de ácido L-láctico contenida en un licor de fermentación se evaluó mediante el mismo procedimiento que en el ejemplo de referencia 1. La concentración de glucosa se midió con el ensayo Glucose Test Wako C (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.).

[Tabla 23]

Medio de fermentación de ácido láctico de bacteria láctica	
Glucosa	60 g/l
Extracto de levadura	5 g/l
Polipeptona	5 g/l
Cloruro de sodio	5 g/l

En primer lugar, la cepa JCM7638 de *Lactococcus lactis* se cultivó de forma estática en 5 ml del medio de fermentación de ácido láctico purgado con nitrógeno gaseoso mostrado en la tabla 23 durante 24 horas a una temperatura de 37 °C en un tubo de ensayo (antes del precultivo preliminar). El cultivo resultante se inoculó en 50 ml de medio fresco de fermentación de ácido láctico purgado con nitrógeno gaseoso y se cultivó de forma estática durante 48 horas a 37 °C (precultivo preliminar). El precultivo preliminar se inoculó en 1,5 l de un medio fresco de fermentación de ácido láctico purgado con nitrógeno gaseoso en el aparato de fermentación continua de tipo de separación por membrana mostrado en la figura 1, un tanque de reacción de fermentación 1 se agitó a 600 rpm con un agitador 5 unido a él, seguido por la regulación de la aireación y el control de la temperatura a 37 °C del tanque de reacción 1, mientras el microorganismo se cultivó durante 24 horas (precultivo). Inmediatamente después de que terminó el precultivo, el microorganismo se cultivó de forma continua en un medio de fermentación de ácido láctico alimentado de forma continua mientras la cantidad de agua de permeación de la membrana se reguló de modo que la cantidad del licor de fermentación en el aparato de fermentación continua se convirtió en 2 l, con lo que se produjo ácido L-láctico mediante fermentación continua. En este momento, se alimentó un nitrógeno gaseoso a partir de un

aparato de alimentación de gas al tanque de reacción de fermentación, y el gas descargado se recuperó y se alimentó de nuevo al interior del tanque de reacción de fermentación. Es decir, el gas que contenía nitrógeno gaseoso se suministró mediante reciclado. En este ensayo de fermentación continua, la cantidad de agua de permeación de la membrana se reguló y se cambió en las condiciones de control del agua de permeación de la membrana descritas anteriormente, durante lo cual la diferencia de carga hidrostática se midió como diferencia de presión transmembrana con un aparato de regulación de la diferencia de carga hidrostática 3. La concentración de ácido L-láctico producido en el licor de fermentación de permeación de la membrana y la concentración de glucosa residual se midieron en un momento apropiado. El rendimiento de ácido L-láctico respecto a azúcar y la tasa de producción de ácido L-láctico, calculadas a partir del ácido L-láctico y la glucosa introducida calculada a partir de la concentración de glucosa se muestran en la tabla 24.

Como resultado del ensayo de fermentación durante 400 horas, la producción estable de ácido L-láctico mediante fermentación continua fue viable mediante el procedimiento de producción de un producto químico, según la presente invención, utilizando el aparato de fermentación continua de tipo de separación por membrana. La diferencia de presión transmembrana fluctuaba dentro de 2 kPa en el periodo completo de fermentación continua.

Ejemplo 30. Producción de ácido L-láctico mediante fermentación continua utilizando una bacteria del ácido láctico (No. 2)

La producción de ácido L-láctico se llevó a cabo utilizando el aparato de fermentación continua en la figura 2. Como un medio, el medio de fermentación de ácido láctico de la bacteria del ácido láctico mostrado en la tabla 23 se utilizó después de esterilización por vapor a alta presión (121 °C, 15 minutos). El medio se utilizó después de esterilización por vapor a alta presión (121 °C, 15 minutos). Como la membrana de separación, se utilizó la membrana porosa preparada en el ejemplo de referencia 2. A menos que se indique lo contrario, las condiciones operativas en este ejemplo son las siguientes:

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

Membrana de separación utilizada: membrana de filtración de fluoruro de polivinilideno

Área de filtración eficaz del elemento de separación por membrana: 120 cm²

Control de la temperatura: 37 (°C)

Aireación del tanque de reacción de fermentación: 50 (ml/min) nitrógeno

Velocidad de agitación del tanque de reacción de fermentación: 600 (rpm)

Esterilización: el tanque de cultivo que incluía el elemento de membrana de separación, y el medio utilizado, se esterilizaron con vapor a alta presión en un autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

Ajuste del pH: ajustado a pH 6,5 con amoníaco acuoso 8 N

Regulación de la cantidad de agua de permeación de la membrana: regulación del caudal mediante diferencia de presión transmembrana

(Desde el inicio de la fermentación continua hasta 150 horas: regulado a de 0,1 kPa o más a 5 kPa o menos,

de 150 horas a 300 horas: regulado a de 0,1 kPa o más a 2 kPa o menos, y

de 300 horas a 400 horas: regulado a de 0,1 kPa o más a 20 kPa o menos)

La cepa JCM7638 de *Lactococcus lactis* se utilizó como el microorganismo procariota y se cultivó de la misma manera que en el ejemplo 29 hasta el precultivo. Inmediatamente después de que terminó el precultivo, el microorganismo se cultivó de forma continua en un medio alimentado de forma continua mientras la cantidad de agua de permeación de la membrana se reguló de modo que la cantidad del licor de fermentación en el aparato de fermentación continua se convirtió en 1,5 l, con lo que se produjo ácido L-láctico mediante fermentación continua. En este momento, se alimentó un nitrógeno gaseoso a partir de un aparato de alimentación de gas al tanque de reacción de fermentación, y el gas descargado se recuperó y se alimentó de nuevo al interior del tanque de reacción de fermentación. Es decir, el gas que contenía nitrógeno gaseoso se suministró mediante reciclado. En este ensayo de fermentación continua, la cantidad de agua de permeación de la membrana se reguló y se cambió en las condiciones de control del agua de permeación de la membrana descritas anteriormente, durante lo cual la diferencia de carga hidrostática se midió como diferencia de presión transmembrana con un aparato de regulación de la diferencia de carga hidrostática 3. La concentración de ácido L-láctico producido en el licor de fermentación de permeación de la membrana y la concentración de glucosa residual se midieron en un momento apropiado. El rendimiento de ácido L-láctico respecto a azúcar calculado a partir del ácido L-láctico y la glucosa introducida calculada a partir de la concentración de glucosa, y la tasa de producción de ácido L-láctico se muestran en la tabla 24.

Como resultado del ensayo de fermentación durante 400 horas, la producción estable de ácido L-láctico mediante fermentación continua fue viable mediante el procedimiento de producción de un producto químico, según la presente invención, utilizando el aparato de fermentación continua en la figura 2. La diferencia de presión transmembrana fluctuaba dentro de 2 kPa en el periodo completo de fermentación continua.

Ejemplo comparativo 15. Producción de ácido L-láctico mediante fermentación discontinua

Como una forma de fermentación utilizando un microorganismo, se llevó a cabo la fermentación discontinua más típica en un fermentador de jarra de 2 l para evaluar su productividad de ácido L-láctico. El medio mostrado en la tabla 23 se utilizó después de esterilización por vapor a alta presión (121 °C, 15 minutos). En este ejemplo comparativo, la cepa JCM7638 de *Lactococcus lactis* se utilizó como el microorganismo procariota, la concentración de ácido L-láctico como un producto se evaluó mediante el procedimiento mostrado en el ejemplo de referencia 1. La concentración de glucosa se midió con el ensayo Glucose Test Wako C (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). Las condiciones operativas en este ejemplo comparativo son las siguientes:

Capacidad del tanque de reacción de fermentación: 1 (l)
Control de la temperatura: 37 (°C)
Aireación del tanque de reacción de fermentación: 50 (ml/min) nitrógeno
Velocidad de agitación del tanque de reacción de fermentación: 200 (rpm)
Ajuste del pH: ajustado a pH 6,5 con amoníaco acuoso 8 N

En primer lugar, la cepa JCM7638 de *Lactococcus lactis* se cultivó de forma estática en 5 ml del medio de fermentación de ácido láctico purgado con nitrógeno gaseoso mostrado en la tabla 23 durante 24 horas a 37 °C (precultivo preliminar). El cultivo resultante se inoculó en 50 ml de un medio fresco de fermentación de ácido láctico purgado con nitrógeno gaseoso y se cultivó de forma estática durante 48 horas a una temperatura de 37 °C (precultivo). El precultivo resultante se inoculó en 1 l del medio de fermentación continua/discontinua mostrado en la tabla 23 en un fermentador de jarra y se sometió a fermentación discontinua. Los resultados de la fermentación discontinua se muestran en la tabla 24.

[Tabla 24]

	Ejemplo comparativo 15	Ejemplo 29	Ejemplo 30
Tiempo de fermentación (h)	40	400	400
Glucosa introducida (g)	90	4.460	3.550
Ácido L-láctico formado (g)	83	3.920	3.060
Glucosa no utilizada (g)	0	60	70
Rendimiento (g/g)	0,92	0,89	0,88
Tasa de producción (g/l/h)	2,1	4,9	5,1

Se pudo revelar que la tasa de producción de ácido L-láctico mejoró significativamente mediante el procedimiento de producción de un producto químico, según la presente invención, utilizando el aparato de fermentación mostrado en las figuras 1 y 2.

Ejemplo de referencia 6. Preparación de ADN cromosómico de la cepa JCM2513 de *Bacillus laevolacticus*

La cepa JCM2513 de *Bacillus laevolacticus* se inoculó en 100 ml de medio GYP (medio GYP descrito en el documento JP-A No. 2003-088392) y se cultivó a una temperatura de 30 °C durante 24 horas para obtener un cultivo. El cultivo resultante se centrifugó a 3000 rpm durante 15 minutos para obtener 0,5 g de microorganismo humedecido, y a partir del microorganismo humedecido, se obtuvo ADN cromosómico mediante un procedimiento de Saito y Miura (Biochem. Biophys. Acta., 72, 619 (1963)). A continuación, 60 µg del ADN cromosómico y 3 U de una enzima de restricción Sau3AI se mezclaron en tampón Tris-HCl 10 mM (NaCl 50 mM, MgSO₄ 10 mM y ditiotritol 1 mM (pH 7,4)) y se hicieron reaccionar a una temperatura de 37 °C durante 30 minutos. La solución de reacción se extrajo con fenol y precipitó con etanol de una manera habitual para obtener 50 µg de fragmento de ADN cromosómico digerido con Sau3AI de la cepa JCM2513 de *Bacillus laevolacticus*.

Ejemplo de referencia 7. Preparación de una biblioteca génica de la cepa JCM2513 de *Bacillus laevolacticus* utilizando un ADN de vector plasmídico

Se mezclaron 20 µg de un ADN de vector plasmídico (pUC19) capaz de replicarse de forma autónoma en *Escherichia coli* y 200 U de una enzima de restricción BamHI en tampón Tris-HCl 50 mM (que contenía NaCl 100 mM, sulfato de magnesio 10 mM (pH 7,4)) y se hicieron reaccionar a una temperatura de 37 °C durante 2 horas para obtener una solución de digestión, y la solución de digestión se extrajo con fenol y precipitó con etanol de una manera habitual.

Seguidamente, el fragmento de ADN derivado del vector plasmídico se desfosforiló mediante tratamiento con una fosfatasa alcalina bacteriana para prevenir la unión de nuevo, se extrajo con fenol y precipitó con etanol de una manera habitual.

Se añadieron 1 µg de este pUC19 digerido con BamHI, y 1 µg del fragmento de ADN cromosómico de la cepa JCM2513 de *Bacillus laevolacticus* digerida con Sau3AI, obtenida en el ejemplo de referencia 6, y 2 U de ADN ligasa T4 (fabricada por Takara Shuzo Co., Ltd.), a tampón Tris-HCl 66 mM (pH 7,5) que contenía cloruro de magnesio 66

mM, ditiotreitolo 10 mM y ATP 10 mM y se hicieron reaccionar a una temperatura de 16 °C durante 16 horas para ligar los ADN. A continuación, la mezcla de ADN resultante se utilizó de una manera habitual para transformar *Escherichia coli* JM109 que se sembró a continuación sobre una placa de medio agar LB que contenía 50 µg/ml de ampicilina sódica, para obtener aproximadamente 20.000 colonias para utilización como una biblioteca génica. A partir de las aproximadamente 20.000 colonias, se recuperó un ADN recombinante. El procedimiento de recuperación siguió el procedimiento de Saito & Miura más arriba, descrito anteriormente.

Ejemplo de referencia 8. Preparación de un huésped para cribar un gen de D-lactato deshidrogenasa

El cribado del gen de D-LDH a partir de la cepa JCM2513 de *Bacillus laevolacticus* se llevó a cabo mediante complementación funcional. El principio se describe en detalle en "DOMINIQUE, G., Appl Environ Microbiol, Estados Unidos (1995) 61 266-272". Es decir, es necesario preparar una cepa de *Escherichia coli* hecha deficiente en actividad D-lactato deshidrogenasa y en actividad piruvato formiato-liasas. Una cepa de *Escherichia coli* hecha deficiente mediante destrucción en el gen de D-lactato deshidrogenasa (ldhA) y en el gen de piruvato formiato-liasas (pflB y pflD) se preparó mediante un procedimiento de Kirill y otros (Kirill, A., PNAS, Estados Unidos (2000) 97 6640-6645). La cepa preparada de este modo se designó cepa TM33 (*E. coli* ΔldhA ΔpflB::KM^r ΔpflD::Cm^r) y se utilizó como un huésped para cribar el gen de D-lactato deshidrogenasa.

Ejemplo de referencia 9. Cribado del gen de D-lactato deshidrogenasa

La cepa TM33 de *Escherichia coli* se inoculó en 100 ml de un medio LB que contenía 50 µg/ml de sulfato de kanamicina y 15 µg/ml de cloranfenicol y se cultivó a una temperatura de 37 °C durante 24 horas para obtener un cultivo. El cultivo obtenido de este modo se centrifugó a 3.000 rpm durante 15 minutos para obtener 0,8 g de microorganismo húmedo. El microorganismo húmedo obtenido se lavó 3 veces con 10 ml de glicerol al 10 % y, a continuación, se suspendió en 0,1 ml de glicerol al 10 % para obtener células competentes. 1 µl de la biblioteca génica derivada de la cepa JCM2513 de *Bacillus laevolacticus*, obtenida en el ejemplo de referencia 8, se añadió a las células competentes, y se introdujo de una manera habitual mediante electroporación en las mismas, y las cepas resultantes se colocaron en un medio agar M9GP (medio M9 + glucosa al 0,4 % + peptona al 0,2 %) que contenía 50 µg/ml de ampicilina sódica para obtener varias cepas capaces de crecer en condiciones anaerobias.

Ejemplo de referencia 10. Análisis de una secuencia de nucleótidos de ADN que contiene el gen de D-lactato deshidrogenasa

A partir de la cepa TM33/pBL2 de *Escherichia coli* que contenía el ADN recombinante obtenido anteriormente, se preparó un plásmido de una manera habitual, y el ADN recombinante resultante se utilizó en secuenciación de nucleótidos. La secuenciación de nucleótidos se llevó a cabo según el procedimiento de Sanger utilizando el kit Taq DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit (fabricado por Applied Biochemical). La secuencia de nucleótidos resultante del ADN que contenía el gen de D-lactato deshidrogenasa fue de 2.995 pares de bases. Se llevó a cabo la búsqueda de un marco de lectura abierto para esta secuencia, y una secuencia de ADN (SEQ ID NO: 10) del gen de D-lactato deshidrogenasa de 1.011 pb se determinó temporalmente utilizando Genetyx (fabricado por Software Kaihatsu Co., Ltd.).

Ejemplo de referencia 11. Preparación de un vector de expresión para el gen de D-lactato deshidrogenasa

El gen de D-LDH se clonó a partir de *Bacillus laevolacticus*. El gen de D-LDH se clonó por PCR y se introdujo de la misma manera en un vector de expresión. El procedimiento de clonación se describe a continuación.

Se cultivó *Bacillus laevolacticus* y, a continuación, se recuperó por centrifugación, seguido de extracción del ADN del genoma con el kit de aislamiento de ADN microbiano UltraClean (fabricado por MO BIO). La operación específica siguió el protocolo adjunto al kit. El ADN genómico resultante se utilizó posteriormente como plantilla en la PCR. El ADN obtenido anteriormente se utilizó como plantilla en la clonación del gen de D-LDH por PCR. En la reacción de amplificación por PCR, se utilizó la polimerasa KOD-Plus (fabricada por Toyobo) con una precisión estimada de 50 veces en comparación con Taq. El tampón de reacción, la mezcla dNTP, etc., utilizados fueron los que se adjuntaron al kit. Los cebadores de amplificación del gen de D-LDH (SEQ ID NO: 11 y 12) se prepararon de tal manera que una secuencia de reconocimiento de XhoI y una secuencia de reconocimiento de NotI se añadieron en los lados terminales 5 y 3, respectivamente.

Cada fragmento de amplificación de la PCR se purificó, después se fosforiló en su extremo con una polinucleótido quinasa T4 (fabricada por TAKARA) y se ligó al vector pUC118 (que se había tratado por escisión con una enzima de restricción HincII y, a continuación, se sometió la superficie de escisión a desfosforilación). Este ligamiento se llevó a cabo con un kit de ligamiento de ADN Ver. 2 (fabricado por TAKARA). El producto de ligamiento se utilizó para transformar DH5α de *Escherichia coli* de la cual se recuperó un ADN plasmídico para obtener un plásmido en el que cada gen de D-LDH había sido subclonado. El vector pUC118 resultante en el que se insertó el gen de D-LDH se escindió con las enzimas de restricción XhoI y NotI, y cada uno de los fragmentos de ADN resultantes se insertó en un sitio de escisión de XhoI/NotI del vector de expresión de levadura pTRS11 (figura 5). El vector de expresión

del gen de D-LDH preparado de este modo se denominó pTM63.

Ejemplo de referencia 12. Introducción del vector de expresión del gen de D-LDH en levadura

- 5 El pTM63 obtenido en el ejemplo de referencia 11 se transformó en la cepa NBRC10505 de *Saccharomyces cerevisiae* de levadura. Esta transformación se llevó a cabo mediante el procedimiento del acetato de litio utilizando el sistema de transformación de levadura YEASTMAKER (fabricado por CLONTECH). La operación siguió el protocolo adjunto al kit. La cepa NBRC10505 de *Saccharomyces cerevisiae* utilizada como huésped es una cepa
10 deficiente en la capacidad de producir uracilo, y su transformante en el que se había introducido pTM63 se puede seleccionar en un medio sin uracilo por la función del gen URA3 que posee pTM63.

- La introducción del vector de expresión del gen de D-LDH en el transformante obtenido de esta manera se confirmó mediante la extracción de un ADN del genoma que contenía ADN plasmídico mediante un kit de extracción de ADN del genoma Gentrukun (fabricado por TAKARA) y utilizando después el ADN del genoma como plantilla en PCR con
15 PreMix Taq (fabricada por TAKARA). Como cebador, se utilizó el cebador utilizado en la clonación del gen de D-LDH. Como resultado, se confirmó que todos los transformantes tienen gen de D-LDH introducido en ellos.

- La cepa NBRC10505 de *Saccharomyces cerevisiae* en la que se había introducido pTM63 se denomina en lo sucesivo cepa NBRC10505/pTM63.

- 20 Ejemplo 31. Producción de ácido D-láctico mediante fermentación continua (No. 1)

- La producción de ácido D-láctico se llevó a cabo utilizando el aparato de fermentación continua de tipo de separación por membrana en la figura 1 y un medio de producción de ácido D-láctico que tenía la composición
25 mostrada en la tabla 25. El medio se utilizó después de esterilización por vapor a alta presión (121 °C, 15 minutos). Como el material del elemento de membrana de separación, se utilizó un moldeo de acero inoxidable y resina de polisulfona. Como la membrana de separación, se utilizó la membrana porosa preparada en el ejemplo de referencia 2. A menos que se indique lo contrario, las condiciones operativas en este ejemplo son las siguientes:

- 30 Capacidad del tanque de reacción de fermentación: 2,0 (l)
Membrana de separación utilizada: membrana de filtración de PVDF
Área de filtración eficaz del elemento de separación por membrana: 120 cm²
Control de la temperatura: 30 (°C)
Aireación del tanque de reacción de fermentación: 0,2 (l/min) aire
35 Velocidad de agitación del tanque de reacción de fermentación: 800 (rpm)
Ajuste del pH: ajustado a pH 5,0 con NaOH 5 N
Esterilización: el tanque de cultivo que incluía el elemento de separación por membrana, y el medio utilizado, se esterilizaron con vapor a alta presión en un autoclave a 121 °C durante 20 minutos.
Regulación de la cantidad de agua de permeación de la membrana: regulación del caudal mediante diferencia de
40 presión transmembrana
(Desde el inicio de la fermentación continua hasta 100 horas: regulado a de 0,1 kPa o más a 5 kPa o menos, de 100 horas a 200 horas: regulado a 2 kPa o menos, y de 200 horas a 320 horas: regulado a de 0,1 kPa o más a 20 kPa o menos)

- 45 La cepa NBRC10505/pTM63 se utilizó como el microorganismo, un medio de producción de ácido D-láctico que tenía la composición mostrada en la tabla 25 se utilizó como el medio, y la concentración de ácido D-láctico como un producto se midió mediante el mismo procedimiento de HPLC que en el ejemplo de referencia 1. La concentración de glucosa se midió con el ensayo Glucose Test Wako C (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.).

- 50 [Tabla 25]

Medio de fermentación de ácido láctico con levadura	
Glucosa	100 g
Base nitrogenada de levadura sin aminoácidos (Difco)	6,7 g
19 aminoácidos estándar excluyendo leucina	152 mg
Leucina	760 mg
Inositol	152 mg
Ácido p-aminobenzoico	16 mg
Adenina	40 mg
Unidad (1/litro)	

En primer lugar, la cepa NBRC10505/pTM63 se cultivó con agitación durante una noche en 5 ml de un medio de producción de ácido D-láctico en un tubo de ensayo (antes del precultivo preliminar). El cultivo resultante se inoculó en 50 ml de un medio fresco de producción de ácido D-láctico y se cultivó con agitación durante 24 horas a una

temperatura de 30 °C en un matraz Sakaguchi de 500 ml (precultivo preliminar). El precultivo preliminar se inoculó en 2,0 l de un medio de producción de ácido D-láctico en el aparato de fermentación continua de tipo de separación por membrana mostrado en la figura 1, un tanque de reacción de fermentación 1 se agitó a 800 rpm con un agitador 5 unido a él, seguido por la regulación de la aireación, el control de la temperatura y el ajuste del pH del tanque de reacción 1, y el microorganismo se cultivó durante 24 horas (precultivo).

Inmediatamente después de que terminó el precultivo, se hizo funcionar la bomba de circulación de licor de fermentación 10, y el microorganismo se cultivó de forma continua en las condiciones en las que, además de las condiciones operativas en el momento del precultivo, se aireó un tanque de separación por membrana 2, un medio de fermentación de ácido D-láctico se alimentó de forma continua, y la cantidad de agua de permeación de la membrana se reguló de modo que la cantidad del licor de fermentación en el aparato de fermentación continua de tipo de separación por membrana se convirtió en 2 l, con lo que se produjo cadaverina mediante fermentación continua. En este ensayo de fermentación continua, la cantidad de agua de permeación de la membrana se reguló y se cambió en las condiciones de control del agua de permeación de la membrana descritas anteriormente, durante lo cual la diferencia de carga hidrostática se midió como diferencia de presión transmembrana con un aparato de regulación de la diferencia de carga hidrostática 3. La concentración de ácido láctico producido en el licor de fermentación de permeación de la membrana y la concentración de glucosa residual se midieron en un momento apropiado. Los resultados en el ensayo de fermentación continua durante 320 horas se muestran en la tabla 26.

La producción estable de ácido D-láctico mediante fermentación continua fue viable mediante el procedimiento de producción de un producto químico, según la presente invención, utilizando el aparato de fermentación continua de tipo de separación por membrana. La diferencia de presión transmembrana fluctuaba dentro de 2 kPa en el periodo completo de fermentación continua.

Ejemplo 32. Producción de ácido D-láctico mediante fermentación continua (No. 2)

La producción de ácido D-láctico se llevó a cabo utilizando el aparato de fermentación continua en la figura 2 y un medio de producción de ácido D-láctico que tenía la composición mostrada en la tabla 25. El medio se utilizó después de esterilización por vapor a alta presión (121 °C, 15 minutos). Como el material del elemento de membrana de separación, se utilizó un moldeo de acero inoxidable y resina de polisulfona. Como la membrana de separación, se utilizó la membrana porosa preparada en el ejemplo de referencia 2. A menos que se indique lo contrario, las condiciones operativas en este ejemplo son las siguientes:

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

Membrana de separación utilizada: membrana de filtración de fluoruro de polivinilideno

Área de filtración eficaz del elemento de separación por membrana: 120 cm²

Control de la temperatura: 30 (°C)

Aireación del tanque de reacción de fermentación: 0,2 (l/min) aire

Velocidad de agitación del tanque de reacción de fermentación: 800 (rpm)

Ajuste del pH: ajustado a pH 5,0 con NaOH 5 N

Esterilización: el tanque de cultivo que incluía el elemento de separación por membrana, y el medio utilizado, se esterilizaron con vapor a alta presión en un autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

Regulación de la cantidad de agua de permeación de la membrana: regulación del caudal mediante diferencia de presión transmembrana

(Desde el inicio de la fermentación continua hasta 90 horas: regulado a de 0,1 kPa o más a 5 kPa o menos, de 90 horas to 180 horas: regulado a de 0,1 kPa o más a 2 kPa o menos, y de 180 horas a 264 horas: regulado a de 0,1 kPa o más a 20 kPa o menos)

La cepa NBRC10505/pTM63 se utilizó como el microorganismo, un medio de producción de ácido D-láctico que tenía la composición mostrada en la tabla 25 se utilizó como el medio, la concentración de ácido D-láctico como un producto se midió mediante el mismo procedimiento de HPLC que en el ejemplo de referencia 1. La concentración de glucosa se midió con el ensayo Glucose Test Wako C (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.).

En primer lugar, la cepa NBRC10505/pTM63 se cultivó con agitación durante una noche en 5 ml de un medio de producción de ácido D-láctico en un tubo de ensayo (antes del precultivo preliminar). El cultivo resultante se inoculó en 50 ml de a medio fresco de producción de ácido D-láctico y se cultivó con agitación durante 24 horas a una temperatura de 30 °C en un matraz Sakaguchi de 500 ml (precultivo preliminar).

El precultivo preliminar se inoculó en 1,5 l de un medio de producción de ácido D-láctico en el aparato de fermentación continua mostrado en la figura 2, un tanque de reacción de fermentación 1 se agitó a 800 rpm con un agitador 5 unido a él, seguido por la regulación de la aireación, control de la temperatura y ajuste del pH del tanque de reacción de fermentación 1, mientras el microorganismo se cultivó durante 24 horas (precultivo). Inmediatamente después de que terminó el precultivo, el microorganismo se cultivó de forma continua mientras un medio de producción de ácido D-láctico se alimentó de forma continua, y la cantidad de agua de permeación de la membrana se reguló de modo que la cantidad del licor de fermentación en el aparato de fermentación continua se convirtió en

1,5 l, con lo que se produjo ácido D-láctico mediante fermentación continua. En este ensayo de fermentación continua, la cantidad de agua de permeación de la membrana se reguló y se cambió en las condiciones de control del agua de permeación de la membrana descritas anteriormente durante lo cual la diferencia de carga hidrostática se midió como diferencia de presión transmembrana con un aparato de regulación de la diferencia de carga hidrostática 3. La concentración de ácido D-láctico producido en el licor de fermentación de permeación de la membrana y la concentración de glucosa residual se midieron en un momento apropiado. La tasa de producción de ácido D-láctico calculada a partir del ácido D-láctico y la glucosa introducida se muestran en la tabla 26.

Como resultado del ensayo de fermentación durante 264 horas, la producción estable de ácido D-láctico mediante fermentación continua fue viable mediante el procedimiento de producción de un producto químico, según la presente invención, utilizando el aparato de fermentación continua en la figura 2. La diferencia de presión transmembrana fluctuaba dentro de 2 kPa en el periodo completo de fermentación continua.

Ejemplo comparativo 16. Producción de ácido D-láctico mediante fermentación discontinua

Como una forma de fermentación utilizando un microorganismo, se llevó a cabo la fermentación discontinua más típica en un fermentador de jarra de 2 l para evaluar su productividad de ácido D-láctico. El medio se utilizó después de esterilización por vapor a alta presión (121 °C, 15 minutos). En este ejemplo comparativo, la cepa NBRC10505/pTM63 se utilizó como el microorganismo, la concentración de ácido D-láctico como un producto se evaluó mediante HPLC, y la concentración de glucosa se midió con el ensayo Glucose Test Wako C (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). Las condiciones operativas en este ejemplo comparativo son las siguientes:

Capacidad del tanque de reacción de fermentación (cantidad de medio de producción de ácido D-láctico): 1,0 (l)

Control de la temperatura: 30 (°C)

Aireación del tanque de reacción de fermentación: 0,2 (l/min) aire

Velocidad de agitación del tanque de reacción de fermentación: 300 (rpm)

Ajuste del pH: ajustado a pH 5,0 con NaOH 5 N

En primer lugar, la cepa NBRC10505/pTM63 se cultivó con agitación durante una noche en 5 ml de producción de ácido D-láctico en un tubo de ensayo (precultivo preliminar). El cultivo resultante se inoculó en 50 ml medio fresco de producción de ácido D-láctico y se cultivó con agitación durante 24 horas a una temperatura de 30 °C en un matraz Sakaguchi de 500 ml (precultivo). El precultivo resultante se inoculó en 1,5 l de medio de producción de ácido D-láctico en un fermentador de jarra. El microorganismo se sometió a fermentación discontinua en el medio de producción de ácido D-láctico. Los resultados se muestran en la tabla 26.

[Tabla 26]

		Ejemplo comparativo 16	Ejemplo 31	Ejemplo 32
Tiempo de fermentación	(h)	75	320	268
Glucosa introducida	(g)	100	2.790	2.340
Ácido D-láctico producido	(g)	18.8	533	442
Glucosa no utilizada	(g)	0	55	50
Rendimiento de ácido D-Láctico	(g/g)	18,8	19,5	19,3
Tasa de producción de ácido D-láctico	(g/l/h)	0,25	0,93	1,10

Se pudo revelar que la tasa de producción de ácido D-láctico mejoró significativamente mediante el procedimiento de producción de un producto químico, según la presente invención, utilizando el aparato de fermentación mostrado en las figuras 1 y 2.

Ejemplo de referencia 13. Preparación de una membrana porosa (No. 5)

Un homopolímero de fluoruro de vinilideno que tenía un peso molecular promedio en peso de 417.000 y γ -butirolactona se fundieron a una temperatura de 170 °C en cantidades del 38 % en peso y el 62 % en peso respectivamente para preparar una solución madre. Esta solución madre, acompañada de γ -butirolactona como un líquido de formación de huecos, se descargó a partir de una base y se enfrió en un baño de enfriamiento que consistía en una solución acuosa al 80 % de γ -butirolactona a una temperatura de 20 °C para preparar una membrana de fibras huecas.

A continuación, el 14 % en peso de homopolímero de fluoruro de vinilideno que tenía un peso molecular promedio en peso de 284.000, el 1 % en peso de acetato-propionato de celulosa (CAP482-0.5 fabricado por Eastman Chemical), el 77 % en peso de N-metil-2-pirrolidona, el 5 % en peso de sorbitán de ácido graso de aceite de coco polioxietilenado (nombre comercial: Ionet T-20C, fabricado por Sanyo Chemical Industries, Ltd.) y el 3 % en peso de agua se mezclaron y se fundieron a una temperatura de 95 °C para preparar una solución madre. Esta solución madre se aplicó uniformemente sobre la superficie de la membrana de fibras huecas y se coaguló inmediatamente en un baño de agua para preparar una membrana de fibras huecas. La membrana de fibras huecas resultante tenía un tamaño de poro promedio de 0,05 μ m en la superficie del lado tratado con agua. Cuando la membrana de

separación se evaluó para su coeficiente de permeabilidad al agua purificada, el coeficiente de permeabilidad al agua purificada fue de $5,5 \times 10^{-9} \text{ m}^3/\text{m}^2 \cdot \text{s} \cdot \text{Pa}$. La medición del coeficiente de permeabilidad al agua purificada se llevó a cabo con agua purificada tratada con membrana de ósmosis inversa a 25 °C con una altura de carga hidrostática de 1 m. La desviación estándar del tamaño de poro promedio fue de 0,006 μm .

Ejemplo 33. Preparación de ácido L-láctico con membrana de fibras huecas (No. 1)

El elemento de membrana de separación mostrado en la figura 4 que tenía un área de filtración eficaz de 120 cm^2 preparada utilizando una membrana porosa preparada en el ejemplo de referencia 13 se utilizó como una membrana de separación en el mismo ensayo de fermentación continua de ácido L-láctico que en el ejemplo 1. Los resultados, junto con los resultados del ejemplo comparativo 1 se muestran en la tabla 27. La producción estable de ácido L-láctico mediante fermentación continua fue viable. La diferencia de presión transmembrana fluctuaba dentro de 2 kPa en el periodo completo de fermentación continua.

Ejemplo 34. Preparación de ácido L-láctico con membrana de fibras huecas (No. 2)

El elemento de membrana de separación mostrado en la figura 4 que tenía un área de filtración eficaz de 120 cm^2 preparada utilizando una membrana porosa preparada en el ejemplo de referencia 13 se utilizó como una membrana de separación en el mismo ensayo de fermentación continua de ácido L-láctico que en el ejemplo 4. Los resultados, junto con los resultados del ejemplo comparativo 1 se muestran en la tabla 27. Se pudo confirmar que la producción estable de ácido L-láctico mediante fermentación continua fue viable. La diferencia de presión transmembrana fluctuaba dentro de 2 kPa en el periodo completo de fermentación continua.

[Tabla 27]

		Ejemplo comparativo 1	Ejemplo 33	Ejemplo 34
Tiempo de fermentación	(h)	72	300	300
Glucosa introducida	(g)	100	3.210	2.600
Ácido L-láctico producido total	(g)	26	1.980	1.570
Glucosa no utilizada	(g)	0	70	60
Rendimiento de ácido L-láctico respecto a azúcar	(g/g)	0,26	0,63	0,62
Tasa de producción de ácido L-Láctico	(g/l/h)	0,36	3,3	3,5

Aplicabilidad industrial

La presente invención da a conocer un procedimiento de producción de un producto químico mediante fermentación continua que mantenía alta productividad de forma estable durante un tiempo largo mediante un sencillo procedimiento operativo. Según la presente invención, la fermentación continua manteniendo alta productividad de forma estable durante un tiempo largo en condiciones operativas sencillas se hace viable, y un producto químico que es un producto de fermentación se puede producir de forma estable a bajo coste ampliamente en la industria de la fermentación.

[LISTA DE SECUENCIAS]

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Toray Industries, Inc

<120> Procedimiento para la producción de un producto químico y fermentador continuo

<130> 06082

<160> 12

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 26

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 1

ES 2 728 376 T3

ctcgagatgg caactctaaa ggatca 26

<210> 2
 <211> 28
 5 <212> ADN
 <212> Artificial

<220>
 <223> primer

10 <400> 2
 gcggccgctt aaaattgcag ctcccttt 28

<210> 3
 15 <211> 999
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 3

20

atggcaactc taaaggatca gctgatttat aatcttctaa aggaagaaca gacccccag	60
aataagatta cagttgttgg gggttggtgct gttggcatgg cctgtgccat cagtatctta	120
atgaaggact tggcagatga acttgctctt gttgatgtca tcgaagacaa attgaagggga	180
gagatgatgg atctccaaca tggcagcctt ttccttagaa caccaaagat tgtctctggc	240
aaagactata atgtaactgc aaactccaag ctggtcatta tcacggctgg ggcacgtcag	300
caagagggag aaagccgtct taatttggtc cagcgtaacg tgaacatatt taaattcatc	360
attcctaattg ttgtaaaata cagcccgaac tgcaagttgc ttattgtttc aaatccagtg	420
gatatcttga cctacgtggc ttggaagata agtgggttttc caaaaaaccg tgttattgga	480
agtggttgca atctggattc agcccgattc cgttacctga tgggggaaag gctgggagtt	540
caccatttaa gctgtcatgg gtgggtcctt ggggaacatg gagattccag tgtgcctgta	600
tggagtggaa tgaatgttgc tgggtgtctct ctgaagactc tgcaccaga tttagggact	660
gataaagata aggaacagtg gaaagaggtt cacaagcagg tggttgagag tgcttatgag	720
gtgatcaaac tcaaaggcta cacatcctgg gctattggac tctctgtagc agatttgga	780
gagagtataa tgaagaatct taggcgggtg caccagttt ccaccatgat taagggtctt	840
tacggaataa aggatgatgt cttccttagt gttccttgca ttttgggaca gaatggaatc	900
tcagaccttg tgaagggtgac tctgacttct gaggaagagg cccgtttgaa gaagagtgc	960
gatacacttt gggggatcca aaaggagctg caattttaa	999

<210> 4
 <211> 80
 25 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> primer

30 <400> 4

ES 2 728 376 T3

	tctcaattat tattttctac tcataacctc acgcaaaata acacagtcaa atcaatcaaa	60
	atggcaactc taaaggatca	80
5	<210> 5 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> primer <400> 5 aggcgtatca cgaggccctt 20	
15	<210> 6 <211> 60 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> primer <400> 6 gaattaattc ttgaagacga aagggcctcg tgatacgct agattgtact gagagtgcac 60	
25	<210> 7 <211> 80 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> primer <400> 7	
35	tatttttcgt tacataaaaa tgcttataaa actttaacta ataattagag attaaatcgc	60
	ctgtgcggtta tttcacaccg	80
40	<210> 8 <211> 25 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> primer	
45	<400> 8 caaatatcgt ttgaatattt ttccg 25	
50	<210> 9 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
55	<220> <223> primer <400> 9 aatccagatt gcaaccactt 20	
60	<210> 10 <211> 1011	

ES 2 728 376 T3

<212> ADN
<213> Bacillus laevolacticus

<400> 10

5

```

atgaaattct tgatgtatgg agtacaagat catgagagag caacgatcga gaattgggca    60
aatcaacatc aggtggagat cgcaacaacc tcagatttcc tctcagaaga tacagtcgct    120
caatcgaaag gctttgacgg tatctgcatt caacagccga ttgcactcgg agggccgaat    180
ttatacactc aattaaaaaa caacgggtatc aaacagattg ctacacgaac agccgggttac    240
gacatgattg atttgaacga agccgagaaa aacagtttgt tggtgaccaa tgttccagca    300
tactccccct acgcagtcgc cgagctcgcg gtcactcagg cgatgcagct cgtccgccat    360
attcctgaat tcaataaacg tgttgacagg aaagattttc gctggtcagg ccttatttcc    420
agagaaatcc gatcattaac ggtcggcata gtcggcaccg gccgcatcgg tgcaacggcc    480
gcacagctct tcaaaggact agggggcaaaa atcattggtt ttgatcaata tcccaacgat    540
cggctaaacg gtatccttga ctatcggcct tcaattgaag acgtgcttaa ggaagctgat    600
atcattttct ttcacacgcc gctttttgat tcgactcggc acatgatcaa taaaagcaca    660
ttaaactga tgaaaaatag tgcctatcta atcaatgttg ccagaggcgg ctttaattaaa    720
actgaagatc tgattgaagc acttgaaaac ggcgaaattg ccggtgcagc gttagatacc    780
tttgaaaatg aactcatgat taataaagat ctgagtaagc agccgctcaa tgatccgctt    840
ctttcgaaac ttctcgaat ggaacaagtg ctgctcacac cgcatgtcgg cttctttact    900
gagaccgcca ttcaaacat tgttgaaggt gccttagaca gtgttgtcga ggttttgaag    960
acaggaacaa gcaaaaatct tgttcaagca caaccgctat cggcaaaaata a    1011

```

<210> 11
<211> 30
<212> ADN
<213> Artificial

10

<220>
<223> primer

15

<400> 11
ctcgagatga aattcttgat gtatggagta 30

<210> 12
<211> 30
<212> ADN
<213> Artificial

20

<220>
<223> primer

25

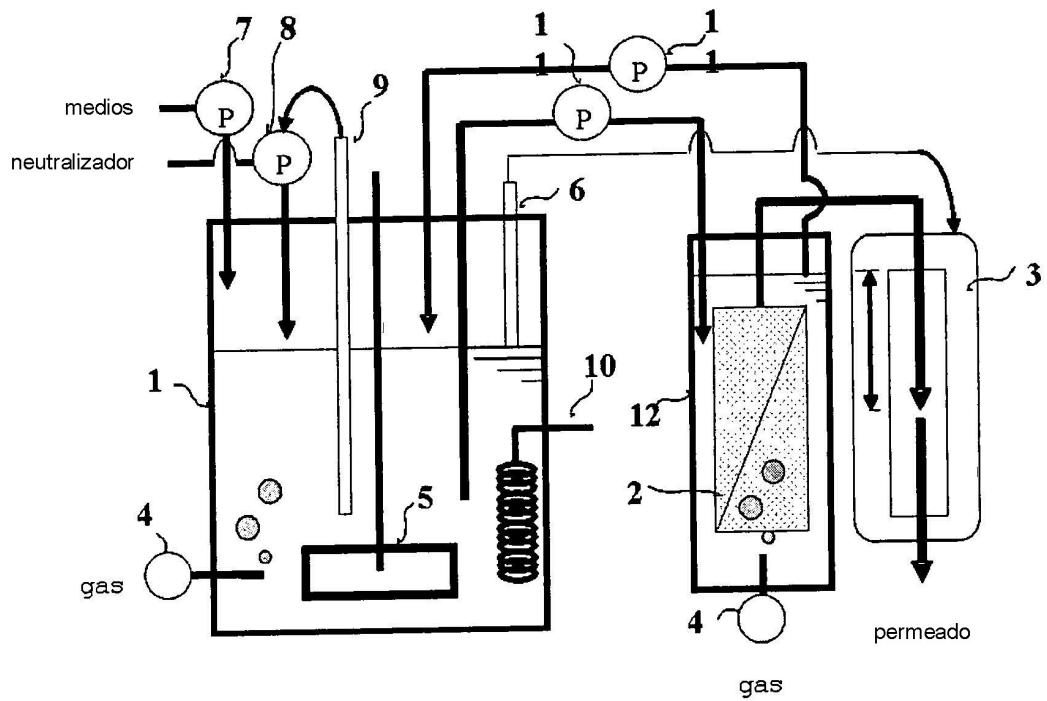
<400> 12
gcggccgctt atttgccga tagcgggtgt 30

30

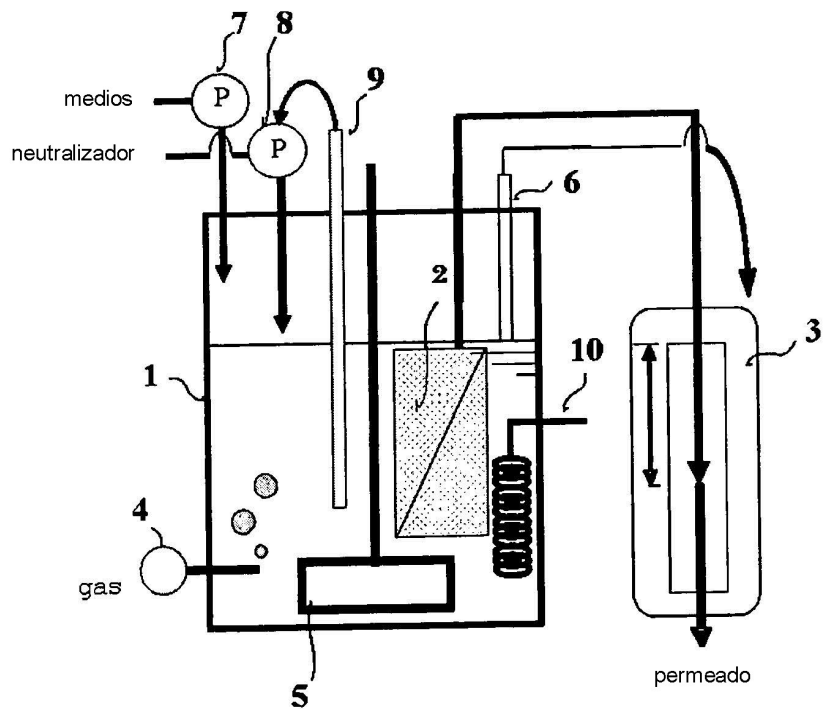
REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento de producción de un producto químico a través de fermentación continua que incluye filtrar un cultivo de un microorganismo o las células cultivadas con una membrana de separación para recuperar un producto a partir de un filtrado y retener simultáneamente un fluido no filtrado en el cultivo, o devolverlo por reflujo al mismo, y añadir materiales de fermentación al cultivo, en el que una membrana porosa que tiene un tamaño de poro promedio de $0,01\ \mu\text{m}$ o más a menos de $1\ \mu\text{m}$ se utiliza como la membrana de separación y la filtración se lleva a cabo con una diferencia de presión transmembrana en el intervalo de $0,1$ a $20\ \text{kPa}$.
- 10 2. Procedimiento de producción de un producto químico, según la reivindicación 1, en el que el coeficiente de permeabilidad al agua purificada de la membrana porosa es de $2 \times 10^{-9}\ \text{m}^3/\text{m}^2/\text{s}/\text{pa}$ o más a $6 \times 10^{-7}\ \text{m}^3/\text{m}^2/\text{s}/\text{pa}$ o menos.
- 15 3. Procedimiento de producción de un producto químico, según la reivindicación 1, en el que el tamaño de poro promedio de la membrana porosa es de $0,01\ \mu\text{m}$ o más a menos de $0,2\ \mu\text{m}$, y la desviación estándar del tamaño de poro de la membrana porosa es $0,1\ \mu\text{m}$ o menos.
- 20 4. Procedimiento de producción de un producto químico, según la reivindicación 1, en el que la membrana porosa es una membrana porosa que contiene una capa de resina porosa.
5. Procedimiento de producción de un producto químico, según la reivindicación 4, en el que la capa de resina porosa es una capa de resina porosa hecha de un polímero orgánico.
- 25 6. Procedimiento de producción de un producto químico, según la reivindicación 4, en el que el material de la membrana de polímero orgánico es fluoruro de polivinilideno.
7. Procedimiento de producción de un producto químico, según la reivindicación 1, en el que el producto químico es un ácido orgánico.
- 30 8. Procedimiento de producción de un producto químico, según la reivindicación 1, en el que el producto químico es ácido láctico.
9. Procedimiento de producción de un producto químico, según la reivindicación 1, en el que el producto químico es cadaverina.
- 35 10. Procedimiento de producción de un producto químico, según la reivindicación 1, en el que el producto químico es un alcohol.
11. Procedimiento de producción de un producto químico, según la reivindicación 1, en el que el producto químico es 1,3-propanodiol.
- 40 12. Procedimiento de producción de un producto químico, según la reivindicación 1, en el que el producto químico es un ácido nucleico.
- 45 13. Procedimiento de producción de un producto químico, según la reivindicación 1, en el que el producto químico es un aminoácido.
14. Aparato de fermentación continua que es un aparato para producir un producto químico a través de fermentación continua que incluye filtrar un cultivo de fermentación de un microorganismo o las células cultivadas con una membrana de separación para recuperar un producto a partir de un filtrado y retener simultáneamente un fluido no filtrado en el cultivo de fermentación, o devolverlo por reflujo al mismo, y añadir materiales de fermentación al cultivo de fermentación, que comprende:
un tanque de reacción de fermentación para cultivo de fermentación de un microorganismo o las células cultivadas;
un tanque de separación por membrana para filtración del cultivo de fermentación, que está conectado mediante
55 medios de circulación del cultivo de fermentación al tanque de reacción de fermentación y dotado en su interior de una membrana de separación; y medios para regular la diferencia de presión transmembrana de la membrana de separación en el intervalo de $0,1$ a $20\ \text{kPa}$,
en el que la membrana de separación es una membrana porosa que tiene un tamaño de poro promedio de $0,01\ \mu\text{m}$ o más a menos de $1\ \mu\text{m}$.
- 60

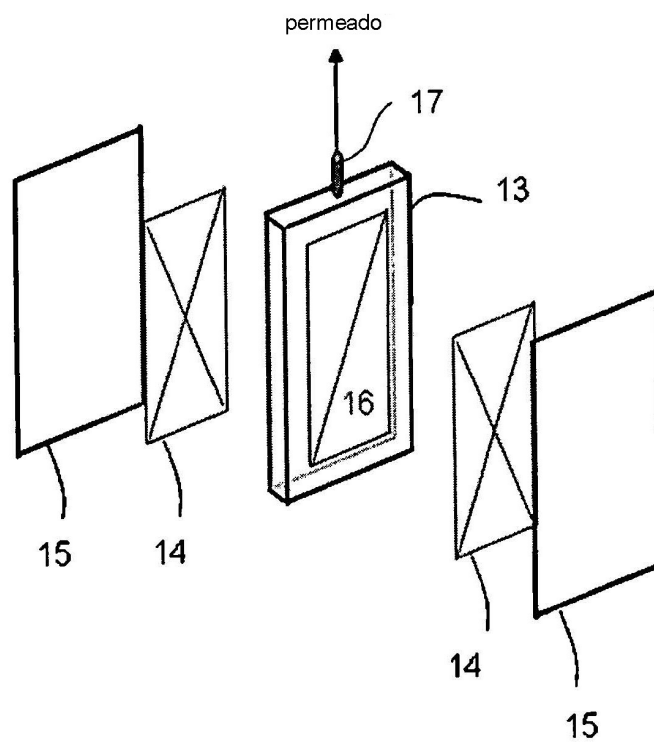
[Figura 1]



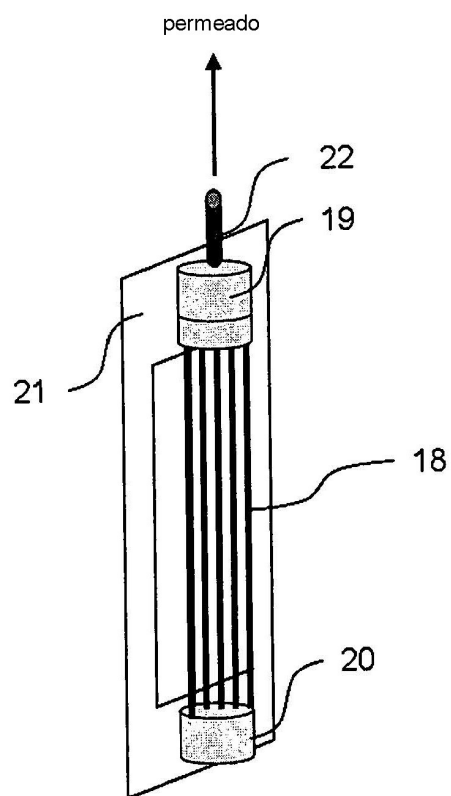
[Figura 2]



[Figura 3]



[Figura 4]



[Figura 5]

