

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 765 889**

51 Int. Cl.:

C07C 51/42 (2006.01)

C12P 7/56 (2006.01)

C07C 59/08 (2006.01)

C08G 63/06 (2006.01)

C08G 63/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.12.2009** **E 16196147 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2019** **EP 3147275**

54 Título: **Procedimiento para la producción de ácido láctico y procedimiento para la producción de ácido poliláctico**

30 Prioridad:

26.12.2008 JP 2008333014

26.12.2008 JP 2008333015

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

11.06.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

SAWAI, KENJI;
SAWAI, HIDEKI;
MIMITSUKA, TAKASHI;
ITO, MASATERU;
YAMADA, KATSUSHIGE;
KAWAMURA, KENJI;
MINEGISHI, SHIN-ICHI;
NAKAGAWA, IZUMI y
NAGANO, TATSUYA

74 Agente/Representante:

DURAN-CORRETJER, S.L.P

ES 2 765 889 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la producción de ácido láctico y procedimiento para la producción de ácido poliláctico

5 **SECTOR TÉCNICO**

La presente invención se refiere a una solución acuosa de ácido láctico al 90 % que es útil para la producción de ácido poliláctico.

10 **ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR**

El ácido láctico se utiliza ampliamente para alimentos, productos farmacéuticos y similares, y también se aplica ampliamente a utilizaciones industriales como material monomérico para el ácido poliláctico, que es un plástico biodegradable, por lo que su demanda está aumentando. Se sabe que el ácido láctico se produce mediante fermentación por microorganismos que convierten los sustratos que contienen carbohidratos, representados por la glucosa, en ácido láctico.

Con el fin de obtener ácido láctico como materia prima para el ácido poliláctico, se requiere un procedimiento de producción de ácido láctico altamente productivo, dado que la cantidad necesaria de ácido láctico es grande. Para mejorar la productividad del ácido láctico, es indispensable un rendimiento elevado con respecto al consumo de azúcar en la fermentación microbiana, así como una tasa elevada de producción de ácido láctico por unidad de tiempo por unidad de volumen, y, en el documento de Patente 1, se da a conocer un procedimiento de mejora de la tasa de producción mediante un aparato de cultivo que utiliza una membrana porosa.

Se puede producir un ácido poliláctico mediante un procedimiento mediante la polimerización por apertura de anillo de lactida, que es un dímero cíclico del ácido láctico, o un procedimiento mediante la polimerización directa de una materia prima de ácido láctico. En el procedimiento de lactida, el ácido láctico se oligomeriza una vez y posteriormente se despolimeriza a la vez que se aísla la lactida producida, que posteriormente se somete a una polimerización por apertura de anillo en presencia de un catalizador. En este procedimiento, el proceso de polimerización es complicado y, por lo tanto, requiere mucha mano de obra y coste. Dado que, en este proceso, las impurezas en la materia prima de ácido láctico pueden eliminarse mediante la operación de aislamiento de la lactida, se puede utilizar una materia prima de ácido láctico de calidad relativamente baja. Sin embargo, dado que las impurezas en la materia prima de ácido láctico, tales como los iones inorgánicos, causan una disminución en el rendimiento de lactida que se aísla, la materia prima del ácido láctico debe estar relativamente libre de impurezas. Por otro lado, en el procedimiento de polimerización directa, la materia prima de ácido láctico se somete a policondensación por deshidratación directa en presencia de un catalizador. En este procedimiento, se puede esperar una simplificación del proceso en comparación con el procedimiento de lactida, pero las impurezas que inhiben la polimerización deben eliminarse de manera preliminar del ácido láctico de materia prima, para proporcionar un ácido láctico de materia prima de elevada calidad. Por lo tanto, la eficiencia de purificación del ácido láctico influye en la mejora de la productividad de la lactida y el ácido poliláctico.

La producción de ácido láctico mediante fermentación microbiana se lleva a cabo mientras se añade una sustancia alcalina al medio de cultivo para mantener el pH óptimo para la fermentación microbiana, y entre los ejemplos de la sustancia alcalina a añadir al medio de cultivo se incluye hidróxido de calcio. En los casos en los que se ha utilizado hidróxido de calcio, el ácido láctico producido mediante fermentación microbiana existe en el medio de cultivo como lactato de calcio. Al añadir una sustancia ácida (por ejemplo, ácido sulfúrico) al medio de cultivo después de completar el cultivo, se puede obtener una solución de ácido láctico libre, pero se produce una sal de calcio (por ejemplo, sulfato de calcio) como una impureza.

Como procedimiento para separar el ácido láctico mediante la eliminación de la sal de calcio derivada, en los casos en los que precipita una sal de calcio insoluble, tal como el sulfato de calcio, se utiliza un procedimiento por filtración a través de papel de filtro cualitativo o similar, pero una pequeña cantidad de la sal de calcio disuelta en la solución no puede eliminarse y permanece en la solución que contiene ácido láctico. Por lo tanto, en los casos en los que este filtrado que contiene ácido láctico se concentra, por ejemplo, en una etapa de purificación posterior, la sal de calcio y otros ácidos inorgánicos solubles se depositan (precipitan) en la solución que contiene ácido láctico libre, lo que ha sido problemático. Se sabe que, si se calienta la solución que contiene ácido láctico de la que los iones inorgánicos no se han eliminado suficientemente, mediante una operación tal como la destilación, los iones inorgánicos permiten que se produzca la racemización y la oligomerización del ácido láctico.

Entre los ejemplos del procedimiento de eliminación de pequeñas cantidades de iones inorgánicos de una solución que contiene ácido láctico se incluyen procedimientos que utilizan resinas de intercambio iónico (por ejemplo, véase el documento de Patente 2). Sin embargo, para mantener el rendimiento de intercambio iónico de la resina de intercambio iónico, la resina de intercambio iónico debe regenerarse periódicamente. Además, dado que la regeneración de una resina de intercambio iónico se lleva a cabo utilizando grandes cantidades de una solución acuosa de hidróxido de sodio y una solución acuosa de ácido clorhídrico, se descarga una gran cantidad de fluido residual durante la regeneración, por lo que se requiere una gran cantidad de coste para la eliminación de residuos

líquidos, lo que ha sido problemático. Además, la regeneración repetida de una resina de intercambio iónico da como resultado una disminución en la tasa de regeneración de la resina de intercambio iónico, así como una disminución en el rendimiento del intercambio iónico, lo que conduce a una disminución en la tasa de eliminación de ácidos inorgánicos, lo que han sido problemático.

5 Además, se conocen también procedimientos de eliminación de pequeñas cantidades de componentes de iones inorgánicos, tales como componentes de calcio de una solución que contiene ácido láctico utilizando un electrodializador con una membrana bipolar (por ejemplo, véase el documento de Patente 3). Sin embargo, la membrana bipolar utilizada en estos procedimientos es costosa y la eficacia de la eliminación de sales inorgánicas, 10 tales como las sales de calcio, no es necesariamente elevada, lo que ha sido problemático.

Además, se han dado a conocer procedimientos de eliminación de sales inorgánicas de una solución que contiene ácido láctico utilizando una membrana de nanofiltración (por ejemplo, véanse los documentos de Patente 4 a 6). Sin embargo, no se ha dado a conocer una etapa de recuperación del ácido láctico por destilación, el efecto de la 15 destilación sobre el rendimiento del ácido láctico y la posibilidad de aplicación del ácido láctico obtenido a la producción a escala industrial de un ácido poliláctico mediante polimerización directa.

Además, en los documentos de Patente 7 a 10, se ha dado a conocer el hecho de que las cantidades de impurezas particulares deben ser inferiores a niveles particulares para obtener un ácido poliláctico de elevado peso molecular, pero no se han dado a conocer las influencias de las impurezas en la estabilidad térmica, la resistencia mecánica y la tonalidad, que son factores importantes para la procesabilidad de los ácidos polilácticos.

El [documento de Patente 11] da a conocer un proceso adicional para producir ácido láctico mediante fermentación con la utilización de cepas seleccionadas de bacterias ácido-lácticas.

25 El [documento no de patente 1] da a conocer ácido láctico altamente puro que tiene una pureza química del 90 %, que se obtuvo mediante fermentación con *Lactobacillus delbrueckii* seguido de purificación mediante ultrafiltración, nanofiltración y electrodiálisis.

30 El [documento de Patente 12] da a conocer un ácido L-láctico altamente puro (calidad de polimerización) obtenido mediante fermentación con *L. delbrueckii*, que tiene una pureza óptica mayor o igual al 99 %.

El [documento de Patente 13] da a conocer un procedimiento para refinar un ácido L-láctico de calidad de polimerización, caracterizado por una multitud de etapas de purificación. En los ejemplos se alcanza una pureza 35 óptica, por ejemplo, del 99,5 %.

El [documento no de patente 2] da a conocer un proceso para producir ácido D-láctico ópticamente puro en medio de sales minerales mediante *Escherichia coli* W3110 manipulada metabólicamente. Se informa de una pureza química, aproximadamente, del 98 % con respecto a los compuestos orgánicos.

40 El [documento no de patente 3] da a conocer un proceso para producir ácido láctico que tiene una pureza óptica no inferior al 99,9 %. Este ácido láctico se obtuvo mediante un proceso de fermentación utilizando *Corynebacterium glutamicum* en privación de oxígeno.

45 DOCUMENTOS DE LA TÉCNICA ANTERIOR

Documentos de patente

- [Documento de Patente 1] WO2007/097260
 50 [Documento de Patente 2] Solicitud de patente PCT traducida al japonés abierta a inspección pública 2001-506274
 [Documento de Patente 3] JP 2005-270025 A
 [Documento de Patente 4] US 5503750
 [Documento de Patente 5] US 5681728
 [Documento de Patente 6] US 2004/0033573
 55 [Documento de Patente 7] JP 6-279577 A
 [Documento de Patente 8] JP 7-133344 A
 [Documento de Patente 9] JP 8-188642 A
 [Documento de Patente 10] JP 9-31170 A
 [Documento de Patente 11] US 2008/254165 A1
 60 [Documento de Patente 12] WO 2004/057008 A1
 [Documento de Patente 13] CN 101 306 993 A

Documentos no de patente

- 65 [Documento no de patente 1] J. VIJAYAKUMAR et al., CHEMICAL AND BIOCHEMICAL ENGINEERING QUARTERLY, vol. 22, no. 2, 2008, págs. 245-264

[Documento no de patente 2] S. ZHOU et al., APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, vol. 69, no. 1, 2003, págs. 399-40

5 [Documento no de patente 3] S. OKINO et al., APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, vol. 78, no. 3, 2008, págs. 449-454

CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION

10 PROBLEMAS A RESOLVER POR LA INVENCION

Uno de los objetivos de la presente invención es dar a conocer una solución acuosa de ácido láctico, que se pueda aplicar a la producción a escala industrial de un ácido poliláctico mediante polimerización directa y pueda utilizarse para síntesis de lactida de rendimiento elevado. Además, la presente invención tiene como objetivo obtener una solución acuosa de ácido láctico en la que las cantidades de impurezas específicas no sean superiores a cierta cantidad.

MEDIOS PARA RESOLVER LOS PROBLEMAS

20 Los inventores de la presente invención estudiaron intensamente para resolver los problemas anteriores y descubrieron que proporcionando una solución acuosa de ácido láctico al 90 %, en la que las cantidades de impurezas particulares no son superiores a niveles particulares, como materia prima para ácido poliláctico, se puede obtener una lactida que tiene un tonalidad excelente y un ácido poliláctico que tiene una excelente estabilidad térmica, resistencia mecánica y tonalidad con rendimientos elevados, completando de este modo la presente invención.

Es decir, la presente invención está constituida por los siguientes puntos (1) a (6).

30 (1) Solución acuosa de ácido láctico al 90 % que contiene metanol a una concentración no superior a 50 ppm, ácido pirúvico a una concentración no superior a 500 ppm, furfural a una concentración no superior a 15 ppm, 5-hidroximetilfurfural a una concentración no superior a 15 ppm, lactato de metilo a una concentración no superior a 600 ppm, ácido acético a una concentración no superior a 500 ppm y ácido 2-hidroxibutírico a una concentración no superior a 500 ppm, en la que la pureza óptica de dicho ácido láctico no es inferior al 99,9 %.

35 (2) La solución acuosa de ácido láctico al 90 %, según el punto (1), que contiene ácido pirúvico a una concentración no superior a 300 ppm.

40 (3) La solución acuosa de ácido láctico al 90 %, según el punto (1) o (2), que contiene metanol a una concentración no superior a 30 ppm.

(4) La solución acuosa de ácido láctico al 90 %, según cualquiera de los puntos (1) a (3), que contiene furfural a una concentración no superior a 5 ppm.

45 (5) La solución acuosa de ácido láctico al 90 %, según cualquiera de los puntos (1) a (4), que contiene ácido acético a una concentración no superior a 300 ppm.

50 (6) La solución acuosa de ácido láctico al 90 %, según cualquiera de los (1) a (5), que contiene ácido 2-hidroxibutírico a una concentración no superior a 200 ppm.

EFFECTO DE LA INVENCION

Mediante la utilización de la solución acuosa de ácido láctico al 90 % anterior, en la cual las cantidades de impurezas específicas no son superiores a cierta cantidad, como materia prima para un ácido poliláctico, se puede obtener un ácido poliláctico que tiene una excelente estabilidad térmica, resistencia mecánica y tonalidad.

DESCRIPCION BREVE DE LOS DIBUJOS

60 La figura 1 es un diagrama esquemático que muestra una realización del aparato de cultivo continuo utilizado para producir ácido láctico.

La figura 2 es un diagrama que muestra la concentración de ácido láctico acumulado y la tasa de producción de ácido láctico durante el cultivo continuo realizado en el ejemplo 1 de la presente invención.

65 La figura 3 es un diagrama esquemático que muestra una realización del aparato de separación por membrana de nanofiltración utilizado para producir ácido láctico.

La figura 4 es un diagrama esquemático que muestra una realización de la vista en sección transversal de la celda en la que se colocó una membrana de nanofiltración, en el aparato de separación por membrana de nanofiltración utilizado para producir ácido láctico.

5

MEJOR MODO DE LLEVAR A CABO LA INVENCION

La presente invención se describirá, a continuación, con más detalle.

10 [Procedimiento de producción de ácido láctico]

Los siguientes procedimientos describen la producción de ácido láctico obtenido a partir de la solución acuosa de ácido láctico al 90 %, de la presente invención.

15 El procedimiento de producción de ácido láctico comprende las etapas (A) a (C) siguientes:

(A) una etapa de fermentación continua en la que un medio de cultivo de fermentación de un microorganismo con capacidad de fermentación ácido-láctica se filtra a través de una membrana porosa que tiene un tamaño de poro promedio no inferior a 0,01 μm e inferior a 1 μm con una diferencia de presión transmembrana dentro del intervalo de 0,1 a 20 kPa, y el permeado se recoge, mientras se retiene el líquido no permeado o se devuelve el líquido no permeado al medio de cultivo, y se añade una materia prima de fermentación al medio de cultivo;

20

(B) una etapa de filtración del permeado obtenido en la etapa (A) a través de una membrana de nanofiltración; y

25

(C) una etapa de destilación de la solución obtenida en la etapa (B) a una presión no inferior a 1 Pa y no superior a la presión atmosférica, no inferior a 25 °C y no superior a 200 °C para recuperar ácido láctico.

A continuación, se describirá el microorganismo que tiene una capacidad de fermentación ácido-láctica, que se utiliza en la etapa (A). El microorganismo que tiene una capacidad de fermentación ácido-láctica no está restringido siempre que pueda producir ácido láctico y, de forma preferente, se utilizará una bacteria ácido-láctica o un microorganismo al que se le ha proporcionado artificialmente una capacidad de fermentación ácido-láctica o cuya capacidad de fermentación ácido-láctica se ha mejorado.

35

En el presente documento, la bacteria ácido-láctica puede definirse como un microorganismo procarionta que produce ácido láctico con un rendimiento no inferior al 50 % con respecto a la glucosa consumida. Entre los ejemplos preferentes de la bacteria ácido-láctica se incluyen las 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*, género *Sporolactobacillus* y género *Bacillus*. Al seleccionar, entre estas, una bacteria ácido-láctica que muestra un rendimiento elevado de ácido láctico con respecto al consumo de azúcar, la bacteria se puede utilizar de forma preferente en la producción de ácido láctico. Además, al seleccionar una bacteria ácido-láctica que muestra un rendimiento elevado de ácido L-láctico o ácido D-láctico con respecto al consumo de azúcar, la bacteria se puede utilizar de forma preferente en la producción de ácido láctico que tenga una elevada pureza óptica.

45

Entre los ejemplos de la bacteria ácido-láctica que muestran un rendimiento elevado de ácido L-láctico con respecto al consumo de azúcar se incluyen *Lactobacillus yamanashiensis*, *Lactobacillus animalis*, *Lactobacillus agilis*, *Lactobacillus aviaries*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus ruminis*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus sharpeae*, *Pediococcus dextrinicus* y *Lactococcus lactis*, que se pueden seleccionar y utilizar para la producción de ácido L-láctico.

50

Entre los ejemplos de la bacteria ácido-láctica que muestra un rendimiento elevado de ácido D-láctico con respecto al consumo de azúcar se incluyen *Sporolactobacillus laebolacticus*, *Sporolactobacillus inulinus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii* y *Lactococcus lactis*, que se pueden seleccionar y utilizar para la producción de ácido D-láctico.

55

Entre los ejemplos del microorganismo al que se ha proporcionado artificialmente una capacidad de fermentación ácido-láctica o cuya capacidad de fermentación ácido-láctica se ha mejorado, se incluyen microorganismos obtenidos por mutagénesis química conocida y microorganismos a los que se ha introducido el gen de una lactato deshidrogenasa (que en adelante se denominará LDH) para proporcionar o mejorar la capacidad de fermentación ácido-láctica. Entre los ejemplos preferentes de los mismos se incluyen microorganismos recombinantes a los que se ha incorporado LDH intracelularmente para mejorar la capacidad de fermentación ácido-láctica.

60

Entre los ejemplos preferentes del huésped de los microorganismos recombinantes se incluyen células procariontas, tales como *E. coli* y bacterias ácido-lácticas; y células eucariotas, tales como la levadura; y de forma más preferente,

65

el huésped es levadura. La levadura pertenece, de forma preferente, al género *Saccharomyces* y, de forma más preferente, la levadura es *Saccharomyces cerevisiae*.

5 El gen LDH utilizado no está restringido siempre que codifique una proteína que tenga una actividad para convertir el dinucleótido de nicotinamida adenina reducido (NADH) y el ácido pirúvico en dinucleótido de nicotinamida adenina oxidado (NAD⁺) y ácido láctico. Por ejemplo, se puede utilizar un gen L-LDH derivado de una bacteria ácido-láctica que muestra un rendimiento elevado de ácido L-láctico con respecto al consumo de azúcar, o un gen D-LDH derivado de una bacteria ácido-láctica que muestra un rendimiento elevado de ácido D-láctico con respecto al consumo de azúcar. Además, entre los ejemplos preferentes del gen L-LDH se incluyen los derivados de eucariotas tales como vaca, ser humano y rana, y el gen L-LDH se deriva de forma más preferente de *Xenopus laevis*. Entre los ejemplos de microorganismos a los que se incorpora un gen L-LDH derivado de una rana se incluyen la levadura recombinante que se da a conocer en la Patente JP 2008-029329 A.

15 Entre los ejemplos del gen LDH utilizado también se incluyen variantes debido a polimorfismos genéticos y mutagénesis. La expresión "polimorfismo genético" significa modificación parcial de la secuencia de bases de un gen debido a la mutación natural que se ha producido en el gen. El término "mutagénesis" significa la introducción artificial de una mutación en un gen. Entre los ejemplos del procedimiento de mutagénesis se incluyen un procedimiento que utiliza un kit de mutagénesis dirigida al sitio (Mutan-K (fabricado por TAKARA BIO INC.)) y un procedimiento que utiliza un kit de mutagénesis aleatoria (BD Diversify PCR Random Mutagenesis (fabricado por CLONTECH)). La LDH utilizada puede tener una o más deleciones y/o inserciones en una parte de su secuencia de bases, siempre que codifique una proteína que tenga una actividad para convertir NADH y ácido pirúvico en NAD⁺ y ácido láctico.

25 A continuación, se describirá la membrana porosa utilizada en la etapa (A). De forma preferente, la membrana porosa utilizada como membrana de separación es menos propensa a la obstrucción por el microorganismo que tiene una capacidad de fermentación ácido-láctica, y tiene la propiedad de mantener de forma estable el rendimiento de filtración durante un tiempo prolongado. Por lo tanto, es importante que la membrana porosa utilizada en el procedimiento anterior tenga un tamaño de poro promedio no inferior a 0,01 μm e inferior a 1 μm . La membrana porosa utilizada en el procedimiento anterior tiene un rendimiento de separación y una permeabilidad adecuada para las propiedades y la utilización del líquido a procesar y, en vista del rendimiento de bloqueo, la permeabilidad y la resistencia a la suciedad, que afectan al rendimiento de separación, la membrana porosa es de forma preferente una que tenga una capa de resina porosa. Como la membrana porosa que tiene una capa de resina porosa, es preferente una que tenga una capa de resina porosa sobre la superficie de un material de base poroso, capa que actúa como una capa con función de separación. El material de base poroso soporta la capa de resina porosa para fortalecer la membrana porosa.

35 El material de base poroso está compuesto por un material orgánico, material inorgánico y/o similares, y se utiliza de forma preferente una fibra orgánica. Entre los ejemplos preferentes del material de base poroso se incluyen telas tejidas y telas no tejidas preparadas utilizando fibras orgánicas, tales como fibras de celulosa, fibras de triacetato de celulosa, fibras de poliéster, fibras de polipropileno y fibras de polietileno, entre las cuales se utilizan de forma preferente telas no tejidas, ya que sus densidades se pueden controlar con relativa facilidad, se pueden producir de manera simple y tienen bajo coste.

45 Como la capa de resina porosa, que actúa como una capa funcional de separación, tal como se ha mencionado anteriormente, se puede utilizar adecuadamente una membrana polimérica orgánica. Entre los ejemplos del material de la membrana polimérica orgánica se incluyen resinas de polietileno, resinas de polipropileno, resinas de cloruro de polivinilo, resinas de difluoruro de polivinilideno, resinas de polisulfona, resinas de polietersulfona, resinas de poliacrilonitrilo, resinas de poliolefina, resinas de celulosa y resinas de triacetato de celulosa, y el material puede ser una mezcla de resinas que contienen estas resinas como componentes principales. En el presente documento, el componente principal significa que el componente está contenido en una cantidad no inferior al 50 % en peso, de forma preferente, no inferior al 60 % en peso. Entre estos, entre los ejemplos más preferentes del material de la membrana porosa se incluyen aquellos que pueden formarse fácilmente mediante soluciones y son excelentes en durabilidad física y resistencia química, tales como resinas de cloruro de polivinilo, resinas de difluoruro de polivinilideno, resinas de polisulfona, resinas de polietersulfona, resinas de poliacrilonitrilo y resinas de poliolefina, entre las cuales se utilizan de forma más preferente resinas de difluoruro de polivinilideno y resinas que las contienen como componentes principales.

50 En el presente documento, como la resina de difluoruro de polivinilideno, se utiliza de forma preferente un homopolímero de fluoruro de vinilideno, y, además de un homopolímero de fluoruro de vinilideno, se utiliza de forma preferente también un copolímero con monómeros de vinilo capaz de copolimerizarse con fluoruro de vinilideno. Entre los ejemplos de los monómeros de vinilo capaces de copolimerizarse con fluoruro de vinilideno se incluyen tetrafluoroetileno, hexafluoropropileno y tricloruro de fluoruro de etileno.

65 Entre los ejemplos de las resinas de poliolefina se incluyen polietileno, polipropileno, polietileno clorado y polipropileno clorado y, de forma preferente, se utiliza polietileno clorado.

A continuación, se describirá una descripción general del procedimiento de preparación de la membrana porosa. En primer lugar, en la superficie del material de base poroso mencionado anteriormente, se forma un revestimiento de una solución de partida que contiene la resina mencionada anteriormente y un disolvente, a la vez que se impregna la solución de partida en el material de base poroso. Posteriormente, solo la superficie revestida del material de base poroso que tiene el revestimiento se pone en contacto con un baño de coagulación que contiene un no disolvente para coagular la resina, a la vez que se forma una capa de resina porosa en la superficie del material de base poroso. El no disolvente puede estar contenido también en la solución de partida. De forma preferente, la temperatura de la solución de partida se selecciona generalmente dentro del intervalo de 15 a 120 °C, en vistas de las propiedades de formación de película.

A la solución de partida, se le puede añadir un agente formador de poros. El agente formador de poros se extrae después de la inmersión en el baño de coagulación, para hacer que la capa de resina sea porosa. La adición del agente formador de poros permite la regulación del tamaño de poro promedio. El agente formador de poros tiene de forma preferente, una elevada solubilidad en el baño de coagulación. Entre los ejemplos del agente formador de poros que se pueden utilizar se incluyen sales inorgánicas, tales como cloruro de calcio y carbonato de calcio. Otros ejemplos del agente formador de poros que se pueden utilizar incluyen polioxialquilenos, tales como polietilenglicol y polipropilenglicol; compuestos macromoleculares solubles en agua, tales como alcohol polivinílico, polivinilbutiral y ácido poliacrílico; y glicerina.

El disolvente disuelve la resina. Actúa sobre la resina y el agente formador de poros para promover la formación de una capa de resina porosa por los mismos. Entre los ejemplos del disolvente que se puede utilizar se incluyen N-metilpirrolidiona (NMP), N,N-dimetilacetamida (DMAc), N,N-dimetilformamida (DMF), dimetilsulfóxido (DMSO), acetona y metil etil cetona. Entre estos, se pueden utilizar de forma preferente NMP, DMAc, DMF y DMSO, en los que las resinas muestran elevadas solubilidades.

Además, se puede añadir también un no disolvente a la solución de partida. Un no disolvente es un líquido que no disuelve una resina. Un no disolvente tiene la acción de regular la tasa de coagulación de una resina, para regular el tamaño de los poros. Entre los ejemplos del no disolvente que se puede utilizar se incluyen agua y alcoholes, tales como metanol y etanol. Entre estos, son preferentes agua y metanol en vista del coste. El no disolvente también puede ser una mezcla de estos.

Tal como se ha mencionado anteriormente, la membrana porosa es, de forma preferente, una membrana porosa formada por un material de base poroso y una capa de resina porosa. El material de base poroso puede estar impregnado con la capa de resina porosa o no impregnado con la capa de resina porosa, que se selecciona según la utilización. El grosor promedio del material de base poroso se selecciona, de forma preferente, dentro del intervalo de 50 μm a 3.000 μm . En los casos en los que la membrana porosa es una membrana de fibras huecas, el diámetro interno de la fibra hueca se selecciona de forma preferente dentro del intervalo de 200 μm a 5.000 μm , y el grosor de la membrana se selecciona de forma preferente dentro del intervalo de 20 μm a 2.000 μm . Una tela o un tejido de punto producido formando una fibra orgánica o una fibra inorgánica en una forma cilíndrica puede estar contenido en la fibra hueca.

La membrana porosa se puede convertir en un elemento de membrana de separación combinándola con un soporte. La forma del elemento de membrana de separación que tiene una membrana porosa no está restringida, y un elemento de membrana de separación en el que se utiliza una placa de soporte como soporte y la membrana porosa se coloca, como mínimo, en un lado de la placa de soporte es una realización preferente del elemento de membrana de separación que tiene la membrana porosa. En casos en los que es difícil asegurar un área de membrana grande en esta realización, es también una realización preferente la colocación de la membrana porosa en ambos lados de la placa de soporte para aumentar la permeabilidad.

El tamaño promedio de poro de la membrana porosa no es inferior a 0,01 μm e inferior a 1 μm . Con un tamaño de poro promedio de la membrana porosa dentro de este intervalo, se puede conseguir un rendimiento elevado de bloqueo que no permite la fuga de células y lodos y una elevada permeabilidad, y además, es menos probable que se produzca obstrucción, por lo que la permeabilidad puede mantenerse con elevada precisión y reproducibilidad durante mucho tiempo. El tamaño de poro promedio de la membrana porosa es, de forma preferente, no superior a 0,4 μm y, de forma más preferente, la operación puede realizarse con un tamaño de poro promedio no inferior a 0,2 μm . En los casos en los que el tamaño de poro promedio es demasiado pequeño, la permeabilidad puede disminuir, de modo que el tamaño de poro promedio no es inferior a 0,01 μm , de forma preferente, no es inferior a 0,02 μm , de forma más preferente, no inferior a 0,04 μm . En el presente documento, el tamaño de poro promedio se puede determinar midiendo los diámetros de todos los poros que se pueden observar dentro de un área de 9,2 μm \times 10,4 μm bajo el microscopio electrónico de barrido con un aumento de 10.000 veces, y promediando los valores medidos.

Además, la desviación estándar σ del tamaño de poro promedio es, de forma preferente, no superior a 0,1 μm . Además, en los casos en los que la desviación estándar del tamaño de poro promedio es pequeña, es decir, en los casos en los que los tamaños de poro son uniformes, es más probable que se obtenga un permeado uniforme y, por

lo tanto, es posible un manejo simple de la operación de fermentación, de modo que la desviación estándar del tamaño de poro promedio es, de forma preferente, tan pequeña como sea posible.

5 La desviación estándar σ del tamaño de poro promedio se calcula según la (ecuación 1) a continuación, en la que N representa el número de poros observables dentro del área mencionada anteriormente de $9,2 \mu\text{m} \times 10,4 \mu\text{m}$, X_k representa los respectivos diámetros medidos, y $X(\text{prom})$ representa el promedio de los tamaños de poro.

[Ecuación 1]

10
$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{k=1}^N (X_k - X(\text{prom}))^2}{N}} \quad (\text{Ecuación 1})$$

15 En la membrana porosa, la permeabilidad al medio de cultivo es una de sus propiedades importantes. Como índice de la permeabilidad, se puede utilizar el coeficiente de permeabilidad al agua pura de la membrana porosa antes de la utilización. El coeficiente de permeabilidad al agua pura de la membrana porosa es, de forma preferente, no inferior a $2 \times 10^{-9} \text{ m}^3/\text{m}^2/\text{s}/\text{pa}$ cuando la cantidad de permeación se mide utilizando agua purificada a una temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$ preparada mediante filtración a través de una membrana de ósmosis inversa, con una altura de la carga hidráulica de 1 m, y en casos en los que el coeficiente de permeabilidad al agua pura es de $2 \times 10^{-9} \text{ m}^3/\text{m}^2/\text{s}/\text{pa}$ a $6 \times 10^{-7} \text{ m}^3/\text{m}^2/\text{s}/\text{pa}$, se puede obtener una cantidad de permeación que es suficiente a efectos prácticos.

20 La rugosidad de la superficie de la membrana en la membrana porosa es un factor que afecta la obstrucción de la membrana de separación y, de forma preferente, en los casos en los que la rugosidad de la superficie de la membrana no es superior a $0,1 \mu\text{m}$, el coeficiente de desprendimiento y la resistencia de membrana de la membrana de separación se pueden suprimir adecuadamente y, por lo tanto, se puede llevar a cabo la fermentación continua con una diferencia de presión transmembrana más baja. Por lo tanto, dado que la obstrucción se puede suprimir para permitir una fermentación continua estable, la rugosidad de la superficie de la membrana es, de forma preferente, lo más pequeña posible.

25 Además, en los casos en los que la rugosidad de la superficie de la membrana sea pequeña, se puede esperar que la fuerza de corte generada en la superficie de la membrana durante la filtración del microorganismo sea pequeña y, por lo tanto, se pueda suprimir la destrucción de microorganismos y la obstrucción de la membrana porosa se puede suprimir. Por lo tanto, se cree que es posible la filtración estable durante mucho tiempo.

30 En el presente documento, la rugosidad de la superficie de la membrana se puede medir utilizando el siguiente microscopio de fuerza atómica (AFM) en las siguientes condiciones.

- Dispositivo

Microscopio de fuerza atómica (Nanoscope IIIa producido por Digital Instruments)

- Condiciones

35 Sonda: Voladizo de SiN (fabricada por Digital Instruments)
 Modo de exploración: Modo de contacto (medición en el aire)
 45 Modo intermitente bajo agua (medición bajo agua)
 Área de exploración: $10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$, $25 \mu\text{m} \times 25 \mu\text{m}$ (medición en el aire) $5 \mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$, $10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$ (medición bajo agua)
 Resolución de exploración: 512×512

- Preparación de la muestra

40 Cuando se realizó la medición, la muestra de membrana se empapó en etanol a temperatura ambiente durante 15 minutos y, a continuación, se remojó en agua RO durante 24 horas, seguido de lavado y secado al aire.

45 La rugosidad de la superficie de la membrana ($d_{\text{rugosidad}}$) se calcula según lo siguiente (ecuación 2) utilizando el AFM anterior, basándose en las alturas de los puntos respectivos en la dirección del eje z.

[Ecuación 2]

50
$$d_{\text{rugosidad}} = \sum_{n=1}^N \frac{|z_n - \bar{z}|}{N} \quad (\text{Ecuación 2})$$

$d_{\text{rugosidad}}$: Rugosidad de la superficie (μm)
 z_n : Altura en la dirección del eje z (μm)

\bar{Z} : Altura promedio (μm) en el área explorada
 N: Número de muestras medidas

5 La diferencia de presión transmembrana durante la filtración de un microorganismo a través de una membrana porosa en la etapa (A) puede ser una con la cual la membrana no se obstruye fácilmente con el microorganismo y los componentes del medio, y es importante llevar a cabo la filtración con una diferencia de presión transmembrana dentro del intervalo de 0,1 a 20 kPa. De forma preferente, la diferencia de presión transmembrana está dentro del intervalo de 0,1 a 10 kPa, de forma más preferente, dentro del intervalo de 0,1 a 5 kPa, aún de forma más preferente, dentro del intervalo de 0,1 a 2 kPa. En los casos en los que la diferencia de presión transmembrana no está dentro del intervalo descrito anteriormente, se puede producir una obstrucción con el microorganismo y los componentes del medio rápidamente y la cantidad de permeación puede disminuir, provocando problemas durante la operación de fermentación continua.

15 En términos de la fuerza impulsora de la filtración, se puede utilizar un sifón que utiliza la diferencia de nivel de líquido (diferencia de carga hidráulica) entre el medio de cultivo de fermentación y el permeado de la membrana porosa para generar la diferencia de presión transmembrana en la membrana porosa. Además, como fuerza impulsora de la filtración, se puede colocar una bomba de succión en el lado del permeado de la membrana porosa, o se puede colocar una bomba de presión en el lado del medio de cultivo de fermentación de la membrana porosa. La diferencia de presión transmembrana se puede controlar cambiando la diferencia de nivel de líquido entre el medio de cultivo de fermentación y el permeado de la membrana porosa. Además, en los casos en los que se utiliza una bomba para generar la diferencia de presión transmembrana, la diferencia de presión transmembrana se puede controlar mediante la presión de succión y, además, la diferencia de presión transmembrana también se puede controlar mediante la presión del gas o líquido que se utiliza para introducir la presión del lado del medio de cultivo de fermentación. En los casos en los que se lleva a cabo dicho control de presión, la diferencia entre la presión en el lado del medio de cultivo de fermentación y la presión en el lado del permeado de la membrana porosa corresponde a la diferencia de presión transmembrana, y se puede utilizar para controlar la diferencia de presión transmembrana.

25 El aparato de fermentación continua utilizado en la etapa (A) no está restringido siempre que se cumplan las condiciones anteriores, y entre los ejemplos preferentes de los mismos se incluyen los que se dan a conocer en la figura 1 y la figura 2 en la Patente WO2007/097260. Además, el elemento de membrana porosa para la filtración de un medio de cultivo de fermentación no está restringido siempre que se cumplan las condiciones anteriores, y entre los ejemplos preferentes de los mismos se incluyen los que se dan a conocer en la figura 3 y la figura 4 en la Patente WO2007/097260.

35 La materia prima de fermentación utilizada en el procedimiento anterior no está restringida siempre que promueva el crecimiento del microorganismo que tiene la capacidad de fermentación ácido-láctica a cultivar, para permitir la producción satisfactoria del ácido láctico de interés. Entre los ejemplos preferentes de la materia prima de fermentación se incluyen medios líquidos convencionales que contienen fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno, sales inorgánicas y, según sea adecuado, micronutrientes orgánicos, tales como aminoácidos y vitaminas, cuando sea necesario. Entre los ejemplos de las fuentes de carbono se incluyen azúcares, tales como glucosa, sacarosa, fructosa, galactosa y lactosa; soluciones de almidón sacarificado que contienen estos azúcares; melaza de boniato; melaza de remolacha azucarera; melaza "high test"; y, además, ácidos orgánicos, tales como ácido acético; alcoholes, tales como etanol; y glicerina. Entre los ejemplos de las fuentes de nitrógeno se incluyen amoniaco gaseoso, amoniaco acuoso, sales de amonio, urea y sales de ácido nítrico; y otras fuentes de nitrógeno orgánico utilizadas de forma complementaria, tales como tartas oleaginosas, líquidos de hidrolizados de soja, digeridos de caseína, otros aminoácidos, vitaminas, licores fermentados de maíz, levaduras o extractos de levadura, extractos de carne, péptidos, tales como peptonas y células de diversos microorganismos de fermentación e hidrolizados de los mismos. Entre los ejemplos de las sales inorgánicas que se pueden añadir según sea adecuado se incluyen sales de ácido fosfórico, sales de magnesio, sales de calcio, sales de hierro y sales de manganeso. En los casos en los que el microorganismo que tiene una capacidad de fermentación ácido-láctica requiere nutrientes particulares para su crecimiento, los nutrientes pueden añadirse como preparaciones o productos naturales que los contengan. También se puede añadir un agente antifonnación, según se requiera. En el procedimiento anterior, el medio de cultivo significa un líquido obtenido como resultado del crecimiento de un microorganismo que tiene una capacidad de fermentación ácido-láctica en una materia prima de fermentación, y la composición de la materia prima de fermentación a añadir adicionalmente se puede cambiar según sea adecuado a partir de la composición de la materia prima de fermentación utilizada al comienzo del cultivo, de modo que se mejore la productividad del ácido láctico.

60 En la operación de cultivo continuo en la etapa (A), se pueden llevar a cabo el cultivo por lotes o el cultivo alimentación-lote en la fase inicial del cultivo para aumentar la concentración de microorganismos, seguido de comenzar el cultivo continuo (retirada), o las células pueden sembrarse a una elevada concentración y someterse a cultivo continuo desde el comienzo del cultivo. Es posible comenzar a suministrar el medio de alimentación y retirar el cultivo en los momentos adecuados. El momento del inicio del suministro del medio de alimentación y el momento del inicio de la retirada del cultivo no son necesariamente los mismos. El suministro del medio de alimentación y la retirada del cultivo pueden llevarse a cabo de forma continua o intermitente. Los nutrientes, tal como se han descrito anteriormente, necesarios para el crecimiento de las células pueden añadirse al medio de alimentación para permitir

el crecimiento continuo de las células. De forma preferente, la concentración del microorganismo en el medio de cultivo se mantiene elevada, dentro del intervalo que no provoca la muerte del microorganismo a una tasa elevada debido a un entorno del medio de cultivo que es inadecuado para el crecimiento del microorganismo, en vista de lograr una producción eficiente. Por ejemplo, manteniendo la concentración a no inferior a 5 g/l en términos de peso seco, se puede obtener una buena eficiencia de producción.

Además, según se requiera, el microorganismo se puede eliminar del fermentador. Por ejemplo, dado que en los casos en los que la concentración de microorganismos en el fermentador es demasiado elevada, es probable que se produzca una obstrucción de la membrana porosa, se puede realizar la eliminación para evitar la obstrucción. Además, dado que el rendimiento productivo para el ácido láctico puede cambiar dependiendo de la concentración de microorganismos en el fermentador, la eliminación del microorganismo puede llevarse a cabo utilizando el rendimiento productivo como índice, para mantener el rendimiento productivo.

La operación de cultivo continuo, permitiendo el crecimiento de células frescas que tienen una capacidad de fermentación ácido-láctica, se lleva a cabo de, forma preferente, en un solo fermentador en vista del control del cultivo. Sin embargo, el número de fermentadores no está restringido siempre que se realice el cultivo continuo para producir el producto mientras se permita el crecimiento de las células. Se puede utilizar una pluralidad de fermentadores debido, por ejemplo, a una pequeña capacidad de cada fermentador. En este caso, se puede obtener una elevada productividad del producto de fermentación incluso mediante cultivo continuo utilizando una pluralidad de fermentadores conectados en paralelo o en serie a través de tuberías.

A continuación, se describirá la filtración a través de una membrana de nanofiltración en la etapa (B).

La membrana de nanofiltración utilizada en el procedimiento anterior también se denomina nanofiltro (membrana de nanofiltración, membrana NF), y se define generalmente como "una membrana que permite la permeación de iones monovalentes, pero bloquea los iones divalentes". Se considera que la membrana tiene huecos pequeños que tienen tamaños de aproximadamente varios nanómetros, y se utiliza principalmente para bloquear partículas pequeñas, moléculas, iones y sales en el agua.

La expresión "filtración utilizando una membrana de nanofiltración" significa que el permeado de la etapa (A) se filtra a través de una membrana de nanofiltración para bloquear o separar las sales inorgánicas disueltas o depositadas como sólidos, mientras permite que una solución de ácido láctico permee como un filtrado. En el presente documento, las sales inorgánicas incluyen cualquier forma de las sales inorgánicas contenidas en el medio de cultivo, tales como las disueltas en el permeado de la etapa (A) y las depositadas o precipitadas en el permeado de la etapa (A).

En la etapa (B), es preferente ajustar el pH del permeado de la etapa (A) a no inferior a 2,0 y no superior a 4,5. Se sabe que las sustancias ionizadas en una solución tienen más probabilidades de ser eliminadas o bloqueadas por una membrana de nanofiltración que las sustancias no ionizadas. Por lo tanto, al ajustar el pH del permeado de la etapa (A) a no superior a 4,5, la proporción de ácido láctico disociado en iones lactato en el permeado se vuelve pequeña, y esto permite una permeación más eficiente del ácido láctico. Además, en los casos en los que el pH es inferior a 2,0, la nanofiltración puede resultar dañada. Además, dado que el pKa del ácido láctico es superior a 3,86, en los casos en los que el pH no es superior a 3,86, el ácido láctico que no se ha disociado en iones lactato e iones hidrógeno está contenido en el permeado de la etapa (A) en una cantidad mayor, por lo que se puede permitir que el ácido láctico permee eficientemente a través de la membrana de nanofiltración, lo cual es más preferente. El ajuste del pH del permeado de la etapa (A) se puede llevar a cabo cuando se realiza la fermentación microbiana o después de la etapa (A). Además, el pH puede ajustarse añadiendo un ácido inorgánico u orgánico en los casos en los que el pH del permeado debe ser más ácido, o añadiendo una sustancia alcalina, tal como hidróxido de calcio o amoníaco acuoso en los casos en los que el pH debe ser más alcalino.

El permeado de la etapa (A) que se aplicará a la membrana de nanofiltración de la etapa (B) se prepara de forma preferente añadiendo una sustancia alcalina al medio de cultivo de la etapa (A) para mantener un pH óptimo para la fermentación microbiana y filtrar el medio de cultivo obtenido a través de una membrana porosa. El microorganismo generalmente se cultiva a un pH de 4 a 8, a una temperatura de 20 a 40 °C. La sustancia alcalina que se va a añadir no está restringida, y se añade de forma preferente una sal de calcio básica.

En los casos en los que la etapa (A) es una etapa de fermentación continua en presencia de una sal de calcio, la etapa (D), en la que el componente de calcio en el permeado en la etapa (A) se elimina como un sulfato insoluble, se puede introducir antes de la etapa (B). Más particularmente, por ejemplo, la etapa (D) se lleva a cabo añadiendo ácido sulfúrico al permeado de la etapa (A) y precipitando/filtrando el componente de calcio en el permeado de la etapa (A) como sulfato de calcio, que es un sulfato insoluble. Al permitir que el filtrado (líquido separado que contiene ácido láctico) pase a través de la membrana de nanofiltración de la etapa (B), el componente de calcio puede eliminarse o bloquearse de manera más eficiente. Entre los ejemplos de las sales de calcio básicas se incluyen hidróxido de calcio, carbonato de calcio, fosfato de calcio, óxido de calcio y acetato de calcio y, de forma preferente, la sal de calcio básica es hidróxido de calcio. En los casos en los que el componente de calcio en el permeado de la etapa (A) se precipita/filtra como un sulfato insoluble, si el número de equivalentes del ácido

sulfúrico añadido al medio de cultivo excede el número de equivalentes de calcio (número de equivalentes de ácido sulfúrico > número de equivalentes de calcio), el exceso de ácido sulfúrico permea parcialmente a través de la membrana de nanofiltración. Si esto es seguido por la exposición del permeado de la etapa (B) a condiciones con calor, tal como concentración o destilación, el ácido sulfúrico permeado puede actuar como un catalizador para promover la oligomerización del ácido láctico, lo que da como resultado una disminución en el rendimiento de la destilación. Por lo tanto, en los casos en los que el componente de calcio en el permeado de la etapa (A) se precipita/filtra como un sulfato insoluble, el número de equivalentes del ácido sulfúrico añadido, de forma preferente, no es mayor que el número de equivalentes del componente de calcio en el permeado de la etapa (A). En los casos en los que el número de equivalentes del ácido sulfúrico añadido se ajusta en función del pH, el pH es, de forma preferente, no inferior a 2,0 dado que, en este caso, el número de equivalentes del ácido sulfúrico no es mayor que el número de equivalentes del componente de calcio.

Como una etapa que precede a la etapa (D) anterior, se puede introducir la etapa (E), en la que se eliminan los ácidos orgánicos distintos del ácido láctico del permeado de la etapa (A) a la vez que se eliminan los cristales de lactato de calcio. Más particularmente, el pH se ajusta mediante la adición de calcio básico al permeado de la etapa (A), y el permeado resultante se filtra a través de una membrana de nanofiltración equivalente a la utilizada en la etapa (B), recogiendo de este modo una solución acuosa que contiene lactato de calcio desde el lado de la alimentación y eliminando ácidos orgánicos, entre los que se incluye el ácido acético, desde el lado del permeado.

En la etapa (E), de forma preferente, el pH del permeado de la etapa (A) se ajusta a no inferior a 6 y no superior a 11. Dado que las membranas de nanofiltración tienen una propiedad con la cual las sustancias ionizadas (disociadas) en una solución es más probable que se bloqueen que las sustancias no ionizadas (no disociadas), al ajustar el pH del medio de cultivo a no inferior a 6, la proporción de ácido láctico disociado en iones en el medio de cultivo (ácido láctico disociado/ácido láctico no disociado) se vuelve mayor que la proporción de ácido acético disociado en iones (ácido acético disociado/ácido acético no disociado). En este caso, una solución acuosa que contiene lactato de calcio puede recogerse eficientemente del lado de alimentación, y los ácidos orgánicos distintos del ácido láctico pueden separarse eficientemente del lado de permeado. Además, en los casos en los que el pH del medio de cultivo es superior a 11, la durabilidad de la membrana de nanofiltración se ve afectada negativamente, lo que no es preferente.

En la etapa (E), los ácidos orgánicos distintos del ácido láctico separados del lado del permeado de la membrana de nanofiltración son los derivados del permeado de la etapa (A) o de la materia prima de fermentación, y el ácido acético se separa de forma preferente.

Entre los ejemplos del calcio básico que se añade, de forma preferente, en la etapa (E) para ajustar el pH del permeado de la etapa (A) se incluyen hidróxido de calcio, carbonato de calcio, fosfato de calcio, óxido de calcio y acetato de calcio en forma de sólidos y soluciones acuosas y, de forma preferente, el calcio básico es hidróxido de calcio. En los casos en los que se añade una solución acuosa, la concentración del calcio básico no está restringida, y el calcio básico a añadir puede estar en forma de una suspensión que tiene una concentración que excede la solubilidad de saturación.

Entre los ejemplos del procedimiento para evaluar los grados de eliminación, bloqueo y filtración de sales inorgánicas disueltas o depositadas como sólidos por la membrana de nanofiltración utilizada en el procedimiento anterior se incluyen un procedimiento de evaluación mediante cálculo de las tasas de eliminación (tasas de bloqueo) de iones inorgánicos, pero el procedimiento no está restringido a este procedimiento. La tasa de bloqueo (tasa de eliminación) de una sal inorgánica se puede calcular según la ecuación 3 midiendo la concentración de la sal inorgánica contenida en el líquido crudo (medio de cultivo) (concentración de sal inorgánica en el líquido crudo) y la concentración de la sal inorgánica contenida en el permeado (solución de ácido láctico) (concentración de sal inorgánica del permeado) mediante un análisis representado por cromatografía iónica.

$$\text{Tasa de eliminación de sal inorgánica (\%)} = (1 - (\text{concentración de sal inorgánica en el permeado} / \text{concentración de sal inorgánica en el líquido crudo})) \times 100 \quad (\text{Ecuación 3})$$

El rendimiento de separación por membrana de la membrana de nanofiltración utilizada en la etapa (B) no está restringido y, de forma preferente, la proporción de la tasa de permeación de sulfato de magnesio con respecto a la tasa de permeación de ácido cítrico a través de la membrana de nanofiltración es no inferior a 3 a una presión de operación de 0,5 MPa, temperatura del líquido crudo de 25 °C y concentración en el líquido crudo de 1.000 ppm. En los casos en los que la proporción de la tasa de permeación del sulfato de magnesio con respecto a la tasa de permeación del ácido cítrico a través de la membrana de nanofiltración en las condiciones anteriores no sea inferior a 3, se pueden eliminar las sales inorgánicas contenidas en el permeado de la etapa (A) y se puede permitir que el ácido láctico permee eficientemente, lo cual es preferente. En el presente documento, la tasa de permeación de sulfato de magnesio se puede calcular, según la ecuación 4, midiendo la concentración de sulfato de magnesio contenido en el líquido crudo (concentración de sulfato de magnesio en el líquido crudo) y la concentración de sulfato de magnesio contenido en el permeado (concentración de sulfato de magnesio en el permeado) por un análisis representado por cromatografía iónica. De manera similar, la tasa de permeación del ácido cítrico se puede calcular reemplazando la concentración de sulfato de magnesio en la ecuación 4 con la concentración de ácido

cítrico y midiendo la concentración de ácido cítrico contenido en el líquido crudo (concentración de ácido cítrico en el líquido crudo) y la concentración de ácido cítrico contenido en el permeado (concentración de ácido cítrico en el permeado) mediante un análisis representado por cromatografía líquida de alta eficacia.

5 Tasa de permeación de sulfato de magnesio (%) = (concentración de sulfato de magnesio en el permeado/concentración de sulfato de magnesio en el líquido crudo) × 100 (Ecuación 4)

Además, la tasa de permeación de sulfato de magnesio es, de forma preferente, no superior al 1,5 % a una presión de operación de 0,5 MPa, temperatura del líquido crudo de 25 °C y la concentración en el líquido crudo de 1.000 ppm. En los casos en los que la tasa de permeación de sulfato de magnesio a través de la membrana de nanofiltración es superior al 1,5 % en las condiciones anteriores, la concentración de la solución de ácido láctico permeada a través de la membrana de nanofiltración puede provocar el depósito de sales inorgánicas, y una operación de destilación puede provocar racemización y oligomerización debido a la influencia de las sales inorgánicas permeadas y puede disminuir el rendimiento de destilación. De forma más preferente, la tasa de permeación de sulfato de magnesio a través de la membrana de nanofiltración no es superior al 1,0 %.

Además, se utilizan de forma preferente membranas de nanofiltración que tienen tasas de eliminación de cloruro de sodio (500 mg/l) no inferiores al 45 %. En términos del rendimiento de permeación de la membrana de nanofiltración, se utiliza de forma preferente una membrana de nanofiltración en la que el caudal de permeación de cloruro de sodio (500 mg/l) por unidad de área de membrana (m³/m²/día) a una presión de filtración de 0,3 MPa no es inferior a 0,5 y no superior a 0,8. El caudal de permeación por unidad de área de membrana (flujo de permeación de membrana) se puede evaluar mediante el cálculo, según la ecuación 5, midiendo la cantidad del líquido permeado, el tiempo de recolección del líquido permeado y el área de la membrana.

25 Flujo de permeación de membrana (m³/m²/día) = cantidad de líquido permeado/área de membrana/tiempo de recolección (Ecuación 5)

Entre los ejemplos del material de la membrana de nanofiltración que se puede utilizar en el procedimiento anterior se incluyen materiales macromoleculares tales como polímeros de acetato de celulosa, poliamidas, poliésteres, poliimidas y polímeros de vinilo. La membrana no está restringida a una membrana constituida por solo uno de los materiales, y puede ser una membrana que comprende varios materiales de membrana. En términos de la estructura de la membrana, la membrana puede ser una membrana asimétrica, que tiene una capa densa, como mínimo, en un lado de la membrana y microporos con tamaños de poro que aumentan gradualmente en la dirección desde la capa densa hacia el interior de la membrana o el otro lado de la membrana, o una membrana compuesta, que tiene una capa funcional muy delgada formada por otro material en la capa densa de una membrana asimétrica. Entre los ejemplos de la membrana compuesta que se puede utilizar se incluyen la membrana compuesta que se describe en la Patente JP 62-201606 A, que tiene un nanofiltro compuesto por una capa funcional de poliamida en una membrana de soporte que comprende polisulfona como material de membrana.

Entre estos, es preferente una membrana compuesta que tenga una capa funcional compuesta por una poliamida, ya que tiene una elevada resistencia a la presión, elevada permeabilidad y un rendimiento elevado de eliminación de solutos, lo que hace que la membrana tenga un alto potencial. Para mantener la durabilidad frente a la presión de operación, la elevada permeabilidad y el rendimiento elevado de bloqueo, se utiliza adecuadamente una membrana que tenga una estructura en la que se utiliza una poliamida como capa funcional, capa que está retenida por un soporte que comprende una membrana porosa y una tela no tejida. Además, como membrana semipermeable de poliamida, es adecuada una membrana de nanofiltración de material compuesto que tiene, sobre un soporte, una capa funcional de una poliamida reticulada obtenida por reacción de policondensación entre una amina polifuncional y un haluro de ácido polifuncional.

En la membrana de nanofiltración que tiene una capa funcional compuesta por una poliamida, entre los ejemplos preferentes del componente de ácido carboxílico de los monómeros que constituyen la poliamida se incluyen ácidos carboxílicos aromáticos tales como ácido trimésico, ácido benzofenonetetracarboxílico, ácido trimelítico, ácido piromelítico, ácido isoftálico, ácido tereftálico, ácido naftalendicarboxílico, ácido difenilcarboxílico y ácido piridincarboxílico. En vista de la solubilidad frente a los disolventes formadores de película, son más preferentes el ácido trimésico, el ácido isoftálico y el ácido tereftálico, y sus mezclas.

Entre los ejemplos preferentes del componente de amina de los monómeros que constituyen la poliamida se incluyen diaminas primarias que tienen un anillo aromático, tales como m-fenilendiamina, p-fenilendiamina, bencidina, metilen-bis-dianilina, 4,4'-diaminobifeniléter, dianisidina, 3,3',4'-triaminobifeniléter, 3,3',4,4'-tetraaminobifeniléter, 3,3'-dioxibencidina, 1,8-naftalendiamina, m(p)-monometilfenilendiamina, 3,3'-monometilamino-4,4'-diaminobifeniléter, 4, N,N'-(4-aminobenzoil)-p(m)-fenilendiamina-2,2'-bis(4-aminofenilbenzoimidazol), 2,2'-bis(4-aminofenilbenzooxazol) y 2,2'-bis(4-aminofenilbenzotiazol); y diaminas secundarias, tales como piperazina, piperidina y derivados de las mismas. Entre estos, se utiliza de forma preferente una membrana de nanofiltración que tiene una capa funcional compuesta por una poliamida reticulada que comprende piperazina o piperidina como monómeros, dado que tiene resistencia al calor y resistencia química además de la resistencia a la presión y la durabilidad. De forma más preferente, la poliamida contiene como componente principal piperazina poliamida

reticulada o piperidina poliamida reticulada y, además, contiene un componente constitutivo representado por la fórmula química (1), aún de forma más preferente contiene una piperazina poliamida reticulada como componente principal y contiene, además, un componente constitutivo representado por la fórmula química (1). Además, de forma preferente, en la fórmula química (1), $n=3$. Entre los ejemplos de la membrana de nanofiltración que tiene una capa funcional compuesta por una poliamida que contiene una piperazina poliamida reticulada como componente principal y que contiene, además, un componente constituyente representado por la fórmula química (1) se incluyen la descrita en la Patente JP 62-201606 A, y entre los ejemplos particulares de las mismas se incluyen UTC60 fabricada por TORAY INDUSTRIES, INC., que es una membrana semipermeable de piperazina poliamida reticulada que tiene una capa funcional compuesta por una poliamida que contiene una piperazina poliamida reticulada como componente principal y que contiene además un componente constituyente representado por la fórmula química (1), en la que $n=3$.

Una membrana de nanofiltración se utiliza generalmente como un elemento de membrana enrollado en espiral y, de forma preferente, la membrana de nanofiltración utilizada en el procedimiento anterior se utiliza también como un elemento de membrana enrollado en espiral. Entre los ejemplos preferentes particulares del elemento de membrana de nanofiltración se incluyen GEsepa, que es una membrana de nanofiltración de acetato de celulosa fabricada por GE Osmonics; NF99 y NF99HF, que son membranas de nanofiltración que tienen una capa funcional compuesta por una poliamida, fabricadas por Alfa-Laval; NF-45, NF-90, NF-200 y NF-400, que son membranas de nanofiltración que tienen una capa funcional compuesta por una poliamida de piperazina reticulada, fabricadas por Filmtec Corporation; y SU-210, SU-220, SU-600 y SU-610, que son módulos de membrana de nanofiltración fabricados por TORAY INDUSTRIES, INC., que tienen UTC60 fabricada por el mismo fabricante, que tiene una capa funcional compuesta por una poliamida que contiene piperazina poliamida reticulada como componente principal y que contiene además un componente constituyente representado por la fórmula química (1). De forma más preferente, el elemento de membrana de nanofiltración es NF99 o NF99HF, que son membranas de nanofiltración que tienen una capa funcional compuesta por una poliamida, fabricadas por Alfa-Laval; NF-45, NF-90, NF-200 o NF-400, que son membranas de nanofiltración que tienen una capa funcional compuesta por una piperazina poliamida reticulada, fabricadas por Filmtec Corporation; o SU-210, SU-220, SU-600 o SU-610, que son módulos de membrana de nanofiltración fabricados por TORAY INDUSTRIES, INC., que tienen UTC60 fabricada por el mismo fabricante, que tiene una capa funcional compuesta por una poliamida que contiene una piperazina poliamida reticulada como componente principal y que contiene, además, un componente constituyente representado por la fórmula química (1). Aún de forma más preferente, el elemento de membrana de nanofiltración es SU-210, SU-220, SU-600 o SU-610, que son módulos de membrana de nanofiltración fabricados por TORAY INDUSTRIES, INC., que tienen UTC60 fabricada por el mismo fabricante, que tiene una capa funcional compuesta por una poliamida que contiene una piperazina poliamida reticulada como componente principal y que contiene además un componente constitutivo representado por la fórmula química (1).

La filtración a través de una membrana de nanofiltración en la etapa (B) puede llevarse a cabo bajo presión y, de forma preferente, la presión de filtración está de forma preferente dentro del intervalo de 0,1 MPa a 8 MPa. En los casos en los que la presión de filtración es inferior a 0,1 MPa, la tasa de permeación de la membrana puede disminuir, mientras que en los casos en los que la presión de filtración es superior a 8 MPa, la membrana puede dañarse. En los casos en los que la membrana se utiliza a una presión de filtración dentro del intervalo de 0,5 MPa a 7 MPa, el flujo de permeación de la membrana es elevado, de modo que la solución de ácido láctico puede permear eficientemente y la posibilidad de dañar la membrana es pequeña, lo que es más preferente. De modo especialmente preferente, la membrana se utiliza a una presión de filtración dentro del intervalo de 1 MPa a 6 MPa.

La concentración de ácido láctico en la etapa (B) no está restringida y, en los casos en los que la concentración es elevada, la concentración de ácido láctico contenido en el permeado de la etapa (B) también es elevada, de modo que el período de tiempo requerido para la concentración se puede acortar, lo cual es preferente en vista de la reducción de costes.

Las concentraciones de las sales inorgánicas en la etapa (B) no están restringidas y, de forma preferente, pueden ser no menos que la solubilidad de saturación. Es decir, en los casos en los que la concentración de una sal inorgánica no es mayor que la solubilidad en saturación, la sal inorgánica se disuelve en el medio de cultivo y, en los casos en los que la concentración de la sal inorgánica no es inferior a la solubilidad en saturación, la sal inorgánica se deposita parcialmente. Sin embargo, en la etapa (B), tanto las sales inorgánicas disueltas en el permeado de la etapa (A) como las sales inorgánicas depositadas o precipitadas en el permeado de la etapa (A) pueden eliminarse o bloquearse, de modo que el ácido láctico pueda filtrarse sin restricción por las concentraciones de sales inorgánicas.

La permeabilidad del ácido láctico a través de la membrana de nanofiltración tras la separación del ácido láctico contenido en el permeado de la etapa (A) mediante el procedimiento anterior puede evaluarse calculando la tasa de permeación del ácido láctico. La tasa de permeación del ácido láctico se puede calcular, según la ecuación 6, midiendo la concentración de ácido láctico contenido en el líquido crudo (medio de cultivo) (concentración de ácido láctico en el líquido crudo) y la concentración del ácido láctico contenido en el permeado (solución que contiene ácido láctico) (concentración de ácido láctico en el permeado) mediante un análisis representado por cromatografía líquida de alta eficacia.

Tasa de permeación de ácido láctico (%) = (concentración de ácido láctico en el permeado)/(concentración de ácido láctico en el líquido crudo) × 100 (Ecuación 6)

5 En el procedimiento para producir ácido láctico, el permeado de la etapa (B) se somete adicionalmente a destilación en la etapa (C), para obtener ácido láctico con elevada pureza. La etapa de destilación se lleva a cabo a una presión reducida no inferior a 1 Pa y no superior a la presión atmosférica (presión normal, aproximadamente, 101 kPa). En los casos en los que la etapa se lleva a cabo a una presión reducida no inferior a 10 Pa y no superior a 30 kPa, la temperatura de destilación puede ser más baja, lo cual es más preferente. La temperatura de destilación en los casos en los que la etapa se lleva a cabo a presión reducida no es inferior a 20 °C ni superior a 200 °C, pero, en los casos en los que la destilación se realiza a una temperatura no inferior a 180 °C, se puede provocar la racemización del ácido láctico por la influencia de impurezas. Por lo tanto, la destilación de ácido láctico se puede realizar, de forma preferente, a una temperatura no inferior a 50 °C y no superior a 180 °C, de forma más preferente, no inferior a 60 °C y no superior a 150 °C.

15 Antes de someterse a la etapa (C), el permeado de la etapa (B) puede concentrarse una vez utilizando un concentrador, tal como un evaporador, o el permeado de la etapa (B) puede someterse adicionalmente a la etapa (F), en la que concentración de ácido láctico aumenta mediante filtración a través de una membrana de ósmosis inversa. En vista de reducir la energía para la concentración, se emplea de forma preferente la etapa (F) para aumentar la concentración de ácido láctico por filtración a través de una membrana de ósmosis inversa. La membrana de ósmosis inversa del presente documento significa un filtro para eliminar iones y/o moléculas de bajo peso molecular que utiliza como fuerza impulsora una diferencia de presión mayor que la presión osmótica del líquido a tratar y entre los ejemplos de las mismas que se pueden utilizar se incluyen membranas de celulosa, tales como aquellas fabricadas de acetato de celulosa y membranas preparadas por policondensación de un compuesto de amina polifuncional y un haluro de ácido polifuncional para proporcionar una capa funcional de separación fabricada de una poliamida sobre una membrana de soporte microporosa. A efectos de suprimir la suciedad, es decir, incrustaciones, en la superficie de la membrana de ósmosis inversa, también se puede utilizar, de forma preferente, una membrana de ósmosis inversa de baja incrustación, que es principalmente para el tratamiento de aguas residuales, membrana de ósmosis inversa que se prepara cubriendo la superficie de una capa funcional de separación fabricada de una poliamida con una solución acuosa de un compuesto que tiene, como mínimo, un grupo reactivo que reacciona con un grupo de haluro de ácido, permitiendo de este modo que los grupos de haluro de ácido que permanecen en la superficie de la capa funcional de separación formen enlaces covalentes con el grupo reactivo. Dado que la mayoría de los iones de calcio divalentes se han eliminado en la etapa (B), se puede llevar a cabo una concentración de membrana estable sin formación de incrustaciones en la superficie de la membrana de ósmosis inversa.

35 Entre los ejemplos de la membrana de ósmosis inversa utilizada de forma preferente en el procedimiento anterior se incluyen membranas compuestas que tienen un polímero de acetato de celulosa como una capa funcional (en lo sucesivo denominadas membranas de ósmosis inversa de acetato de celulosa) y membranas compuestas que tienen una capa funcional de poliamida (en lo sucesivo denominadas membranas de ósmosis inversa de poliamida). En el presente documento, entre los ejemplos del polímero de acetato de celulosa se incluyen polímeros preparados con ésteres de celulosa de ácido orgánico tales como acetato de celulosa, diacetato de celulosa, triacetato de celulosa, propionato de celulosa y butirato de celulosa, que se pueden utilizar únicamente, como una mezcla o como un éster mixto. Entre los ejemplos de la poliamida se incluyen polímeros lineales y polímeros reticulados constituidos por monómeros de diamina alifáticos y/o aromáticos.

45 Entre los ejemplos de la forma de la membrana que se puede utilizar, según sea adecuado, se incluyen membrana plana, membrana enrollada en espiral y membrana de fibras huecas.

50 Entre los ejemplos particulares de la membrana de ósmosis inversa utilizada en el procedimiento anterior se incluyen módulos de membrana de ósmosis inversa de poliamida fabricados por TORAY INDUSTRIES, INC., tales como módulos de tipo de baja presión SU-710, SU-720, SU-720F, SU-710L, SU-720L, SU-720LF, SU-720R, SU-710P y SU-720P, así como los módulos de tipo de presión elevada SU-810, SU-820, SU-820L y SU-820FA que contienen UTC70 como membrana de ósmosis inversa; membranas de ósmosis inversa de acetato de celulosa fabricadas por el mismo fabricante SC-L100R, SC-L200R, SC-1100, SC-1200, SC-2100, SC-2200, SC-3100, SC-3200, SC-8100 y SC-8200; NTR-759HR, NTR-729HF, NTR-70SWC, ES10-D, ES20-D, ES20-U, ES15-D, ES15-U y LF10-D fabricadas por Nitto Denko Corporation; RO98pHt, RO99, HR98PP y CE4040C-30D fabricadas por Alfa-Laval; GE Sepa fabricada por GE; y BW30-4040, TW30-4040, XLE-4040, LP-4040, LE-4040, SW30-4040 y SW30HRLE-4040 fabricadas por FilmTec Corporation.

60 [Ácido láctico]

Los inventores de la presente invención descubrieron que el procedimiento anterior consiguió una solución acuosa de ácido láctico al 90 %, de la presente invención, que contenía solo pequeñas cantidades de impurezas y, por lo tanto, la calidad del ácido láctico era lo suficientemente elevada como para ser utilizado para la producción de un ácido poliláctico mediante polimerización directa. Además, los inventores de la presente invención especificaron los intervalos de los contenidos de impurezas de dicha solución acuosa de ácido láctico al 90 %, de la presente

invencción, que es útil para obtener lactida (materia prima para ácido poliláctico) y ácido poliláctico de elevada calidad, completando de este modo la presente invencción. La primera característica de la presente invencción es que la solución acuosa de ácido láctico al 90 % contiene, como impureza, metanol a una concentración no superior a 50 ppm, de forma preferente, no superior a 30 ppm. El contenido de metanol en una solución acuosa de ácido láctico al 90 %, de la presente invencción, se puede medir por cromatografía de gases (GC). En los casos en los que la solución acuosa de ácido láctico al 90 % tiene un contenido de metanol superior a 50 ppm, el ácido poliláctico obtenido por policondensación por deshidratación directa de ácido láctico tiene un peso molecular promedio en peso bajo y una baja resistencia mecánica, lo que no es preferente. Además, en los casos en los que se utilizó una solución acuosa de ácido láctico al 90 % que tenía un contenido de metanol superior a 50 ppm, el rendimiento sintético de lactida disminuyó, lo que no es preferente.

La segunda característica de la presente invencción es que la solución acuosa de ácido láctico al 90 %, de la presente invencción, contiene, como impureza, ácido pirúvico a una concentración no superior a 500 ppm, de forma preferente, no superior a 400 ppm, de forma más preferente, no superior a 300 ppm. El contenido de ácido pirúvico en una solución acuosa de ácido láctico al 90 % se puede medir mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). En los casos en los que la solución acuosa de ácido láctico al 90 % tiene un contenido de ácido pirúvico superior a 500 ppm, se obtiene una tonalidad indeseable para el ácido poliláctico producido mediante la polimerización del ácido láctico. La tonalidad de un ácido poliláctico se puede evaluar en función del grado de coloración y, como índice del grado de coloración, se puede utilizar el número de color en unidades APHA. El número de color en unidades APHA (número de color Hazen) es un valor calculado según el procedimiento de medición de la norma JISK0071-1 (establecida el 20 de octubre de 1998). Además, en los casos en los que se utilizó una solución acuosa de ácido láctico al 90 % que tenía un contenido de ácido pirúvico superior a 500 ppm, el rendimiento sintético de lactida disminuyó y el número de color en unidades APHA aumentó, lo que no es preferente.

La tercera característica de la presente invencción es que la solución acuosa de ácido láctico al 90 % contiene, como impureza, furfural a una concentración no superior a 15 ppm, de forma preferente, no superior a 10 ppm, de forma más preferente, no superior a 5 ppm. El contenido de furfural en una solución acuosa de ácido láctico al 90 % se puede medir mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). En los casos en los que la solución acuosa de ácido láctico al 90 % tiene un contenido de furfural superior a 10 ppm, se obtienen una tonalidad y una estabilidad térmica indeseables para el ácido poliláctico producido mediante la polimerización del ácido láctico. La estabilidad térmica de un ácido poliláctico se puede evaluar en función de la tasa de pérdida de peso térmica. Además, en los casos en los que se utilizó una solución acuosa de ácido láctico al 90 % que tenía un contenido de furfural superior a 15 ppm, se produjo un aumento en el número de color en unidades APHA en la lactida obtenida, lo que no es preferente.

La cuarta característica de la presente invencción es que la solución acuosa de ácido láctico al 90 %, de la presente invencción, contiene, como impureza, 5-hidroximetilfurfural a una concentración no superior a 15 ppm, de forma preferente, no superior a 10 ppm, de forma más preferente, no superior a 5 ppm. El contenido de 5-hidroximetilfurfural en una solución acuosa de ácido láctico al 90 % se puede medir mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). Cuando se utiliza una solución acuosa de ácido láctico al 90 %, que tiene un contenido de 5-hidroximetilfurfural superior a 10 ppm para la polimerización del ácido láctico, el ácido poliláctico obtenido tiene una tonalidad y una estabilidad térmica indeseables. Además, en los casos en los que se utilizó una solución acuosa de ácido láctico al 90 % que tenía un contenido de 5-hidroximetilfurfural superior a 15 ppm, se produjo un aumento en el número de color en unidades APHA en la lactida obtenida, lo que no es preferente.

La quinta característica de la presente invencción es que la solución acuosa de ácido láctico al 90 %, de la presente invencción, contiene, como impureza, lactato de metilo a una concentración no superior a 600 ppm, de forma preferente, no superior a 400 ppm, de forma más preferente, no superior a 100 ppm. El contenido de lactato de metilo en una solución acuosa de ácido láctico al 90 % se puede medir por cromatografía de gases (GC). En los casos en los que la solución acuosa de ácido láctico al 90 % tiene un contenido de lactato de metilo superior a 600 ppm, el ácido poliláctico obtenido mediante policondensación por deshidratación directa de ácido láctico tiene un peso molecular promedio en peso bajo y una baja resistencia mecánica, lo que no es preferente. Además, en los casos en los que se utilizó una solución acuosa de ácido láctico al 90 % que tenía un contenido de lactato de metilo superior a 600 ppm, se produjo un aumento en el número de color en unidades APHA en la lactida obtenida, lo que no es preferente.

La sexta característica de la presente invencción es que la solución acuosa de ácido láctico al 90 %, de la presente invencción, contiene, como impureza, ácido acético a una concentración no superior a 500 ppm, de forma preferente, no superior a 400 ppm, de forma más preferente, no superior a 300 ppm. El contenido de ácido acético en una solución acuosa de ácido láctico al 90 % se puede medir mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). Cuando se utiliza una solución acuosa de ácido láctico al 90 % que tiene un contenido de ácido acético superior a 500 ppm para la polimerización del ácido láctico, el ácido poliláctico obtenido tiene una estabilidad térmica indeseable. Además, en los casos en los que se utilizó una solución acuosa de ácido láctico al 90 % que tenía un contenido de ácido acético superior a 500 ppm, disminuyó el rendimiento sintético de lactida, lo que no es preferente.

La séptima característica de la presente invención es que la solución acuosa de ácido láctico al 90 %, de la presente invención, contiene, como impureza, ácido 2-hidroxibutírico a una concentración no superior a 500 ppm, de forma preferente, no superior a 300 ppm, de forma más preferente, no superior a 200 ppm. El contenido de ácido 2-hidroxibutírico en una solución acuosa de ácido láctico al 90 % se puede medir mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). Cuando se utiliza una solución acuosa de ácido láctico al 90 % que tiene un contenido de ácido 2-hidroxibutírico superior a 500 ppm para la polimerización de ácido láctico, el ácido poliláctico obtenido tiene una estabilidad térmica indeseable. Además, en los casos en los que se utilizó una solución acuosa de ácido láctico al 90 % que tiene un contenido de ácido 2-hidroxibutírico superior a 500 ppm, el rendimiento sintético de lactida disminuye, lo que no es preferente.

El ácido láctico de la solución acuosa de ácido láctico al 90 %, de la presente invención, puede ser uno de estructura (L) o estructura (D), o una mezcla de estructura (L) y estructura (D). En los casos en los que el ácido láctico es una mezcla, la pureza óptica, que indica el contenido de isómeros de la estructura (L) o la estructura (D), es de forma preferente no inferior al 99,9 % dado que el punto de fusión del ácido poliláctico obtenido es elevado en este caso

[Lactida]

La lactida producida utilizando la solución acuosa de ácido láctico al 90 %, de la presente invención, como materia prima incluye L,L-lactida, D,D-lactida y D,L-lactida, que están compuestas por ácido L-láctico y/o ácido D-láctico. La lactida es, de forma preferente, L,L-lactida o D,D-lactida.

El procedimiento para producir la lactida no está restringido y, de forma preferente, se puede utilizar un procedimiento convencional, en el que el ácido láctico se calienta a presión reducida para producir oligómeros de ácido láctico, que posteriormente se despolimerizan por calentamiento en presencia de un catalizador a presión reducida, para provocar la conversión en lactida. El catalizador utilizado para la despolimerización de oligómeros de ácido láctico no está restringido y, de forma preferente, es generalmente un catalizador que tiene un metal seleccionado entre el grupo que consiste en el grupo IA, grupo IIIA, grupo IVA, grupo IIB, grupo IVB y grupo VA en la tabla periódica o que tiene un compuesto metálico que lo contiene.

Entre los ejemplos del catalizador que tiene un metal que pertenece al grupo IA se incluyen hidróxidos de metales alcalinos (por ejemplo, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio e hidróxido de litio), sales entre metales alcalinos y ácidos débiles (por ejemplo, lactato de sodio, acetato de sodio, carbonato de sodio, octilato de sodio, estearato de sodio, lactato de potasio, acetato de potasio, carbonato de potasio y octilato de potasio) y alcóxidos de metales alcalinos (por ejemplo, metóxido de sodio, metóxido de potasio, etóxido de sodio y etóxido de potasio).

Entre los ejemplos del catalizador que tiene un metal que pertenece al grupo IIIA se incluyen etóxido de aluminio, isopropóxido de aluminio, óxido de aluminio y cloruro de aluminio.

Entre los ejemplos del catalizador que tiene un metal que pertenece al grupo IVA se incluyen catalizadores de organoestaño (lactato de estaño, tartrato de estaño, dicaprilato de estaño, dilaurato de estaño, dipalmitato de estaño, diestearato de estaño, dioleato de estaño, α -naftoato de estaño, β -naftoato de estaño y octilato de estaño), así como polvo de estaño, óxido de estaño y haluros de estaño.

Entre los ejemplos del catalizador que tiene un metal que pertenece al grupo IIB se incluyen polvo de zinc, haluros de zinc, óxido de zinc y compuestos de organozinc.

Entre los ejemplos del catalizador que tiene un metal que pertenece al grupo IVB se incluyen compuestos de titanio tales como titanato de tetrapropilo; y compuestos de circonio tales como isopropóxido de circonio.

Entre los ejemplos del catalizador que tiene un metal que pertenece al grupo VA se incluyen compuestos de antimonio tales como trióxido de antimonio; y compuestos de bismuto tales como óxido de bismuto (III).

Entre estos, es preferente un catalizador que tenga estaño o un compuesto de estaño en vista de la actividad y es especialmente preferente el octilato de estaño.

La cantidad del catalizador a utilizar es, aproximadamente, del 0,01 al 20 % en peso, de forma preferente, aproximadamente, del 0,05 al 15 % en peso, de forma más preferente, aproximadamente, del 0,1 al 10 % en peso, con respecto a los oligómeros de ácido láctico.

La reacción de despolimerización se puede llevar a cabo utilizando un recipiente de reacción vertical convencional, o se puede llevar a cabo utilizando un destilador molecular. Entre los ejemplos de destilador molecular se incluyen los de tipo de crisol, de tipo película descendente y de tipo centrífugo. Los aparatos de tipo película descendente y de tipo centrífugo son aparatos de proceso continuo, y ampliamente utilizados industrialmente. Un tipo de destilador molecular centrífugo utiliza un procedimiento en el que una película de una sustancia vaporizada se expande sobre una superficie caliente utilizando la fuerza centrífuga, y un tipo de destilador molecular de película descendente

utiliza un procedimiento en el que se permite que una sustancia vaporizada fluya hacia abajo a lo largo de una superficie caliente para formar una película delgada de la sustancia vaporizada.

5 La temperatura de despolimerización se establece entre 160 y 300 °C, de forma preferente, entre 180 y 260 °C, de forma más preferente, entre 190 y 250 °C. En casos en los que la temperatura es inferior a 160 °C, la destilación de lactida es difícil y se requiere un elevado grado de vacío. Por otro lado, en los casos en los que la temperatura es superior a 300 °C, es probable que se produzca racemización y coloración.

10 La presión dentro del aparato de despolimerización no es superior a la presión de vapor de la lactida a la temperatura de despolimerización, y habitualmente es de, aproximadamente, 1 a 50 Torr. Es preferente una presión más baja ya que, en este caso, la temperatura de calentamiento puede ser baja. Más particularmente, la presión es, de forma preferente, de 1 a 20 Torr, de forma más preferente, de 1 a 10 Torr, aún de forma más preferente, de 1 a 5 Torr.

15 De forma preferente el tiempo de residencia en el aparato de despolimerización es lo más corto posible para evitar la racemización y, generalmente, no superior a 1 hora. Es preferente la utilización de un destilador molecular dado que, en este caso, el tiempo puede ser no superior a 10 minutos, de forma preferente, no superior a 3 minutos, de forma más preferente, no superior a 1 minuto.

20 La lactida se puede eliminar al exterior del sistema de reacción de despolimerización como un vapor, y se recoge. La recolección de lactida se puede llevar a cabo simplemente utilizando un condensador conectado al aparato de despolimerización.

[Ácido poliláctico]

25 El ácido poliláctico producido utilizando la solución acuosa de ácido láctico al 90 %, de la presente invención, como materia prima incluye un homopolímero de unidades de ácido L-láctico o unidades de ácido D-láctico; un copolímero de bloques de ácido poliláctico constituido por un segmento compuesto por unidades de ácido poli-L-láctico y un segmento compuesto por unidades de ácido poli-D-láctico; y un copolímero con monómeros distintos del ácido
30 láctico. En los casos en los que el ácido poliláctico es un copolímero, entre los ejemplos de las unidades monoméricas distintas al ácido láctico se incluyen compuestos de glicol tales como etilenglicol, propilenglicol, butanodiol, heptanodiol, hexanodiol, octanodiol, nonanodiol, decanodiol, 1,4-ciclohexanodimetanol, neopentilglicol, glicerina, pentaeritritol, bisfenol A, polietilenglicol, polipropilenglicol y politetrametilenglicol; ácidos dicarboxílicos, tales como ácido oxálico, ácido adípico, ácido sebáico, ácido azelaico, ácido dodecanodioico, ácido malónico, ácido
35 glutárico, ácido ciclohexanodicarboxílico, ácido tereftálico, ácido isoftálico, ácido ftálico, ácido naftalendicarboxílico, bis(p-carboxifenil)metano, ácido antracendicarboxílico, ácido difenil éter dicarboxílico, ácido sulfoisoftálico de sodio y ácido isoftálico de tetrabutilfosfonio; ácidos hidroxicarboxílicos, tales como ácido glicólico, ácido hidroxipropiónico, ácido hidroxibutírico, ácido hidroxivalérico, ácido hidroxicaproico y ácido hidroxibenzoico; y lactonas tales como caprolactona, valerolactona, propiolactona, undecalactona y 1,5-oxepan-2-ona. De forma preferente, la cantidad de copolimerización de los otros componentes de copolimerización descritos anteriormente es del 0 al 30 % molar, de
40 forma más preferente, del 0 al 10 % molar con respecto a los componentes monoméricos totales.

El procedimiento para producir el ácido poliláctico no está restringido, y se puede utilizar un procedimiento de producción convencional para ácido poliláctico. Entre los ejemplos particulares del procedimiento conocido se incluyen el procedimiento de lactida constituido por dos etapas, en el que la lactida, que es un dímero cíclico, se produce en primer lugar utilizando ácido láctico como materia prima, seguido de una polimerización por apertura de anillo; y el procedimiento de polimerización directa constituido por una sola etapa, en el que la materia prima se somete a policondensación por deshidratación directa en un disolvente. Se puede utilizar cualquiera de estos
45 procedimientos.

50 En el procedimiento de lactida y el procedimiento de polimerización directa, el período de tiempo requerido para la polimerización se puede acortar utilizando un catalizador para la reacción de polimerización. Entre los ejemplos del catalizador se incluyen metales tales como estaño, zinc, plomo, titanio, bismuto, circonio, germanio, antimonio y aluminio, y derivados de los mismos. De forma preferente, los derivados son alcóxidos metálicos, carboxilatos, carbonatos, óxidos y haluros. Entre los ejemplos particulares de los mismos se incluyen cloruro de estaño, acetato de estaño, octilato de estaño, cloruro de zinc, óxido de plomo, carbonato de plomo, cloruro de titanio, alcoxitanio, óxido de germanio y óxido de circonio. Entre estos, son preferentes los compuestos de estaño, y los más preferentes el acetato de estaño y el octilato de estaño.
55

60 La reacción de polimerización se puede llevar a cabo en presencia del catalizador anterior habitualmente a una temperatura de 100 a 200 °C, aunque la temperatura varía dependiendo del tipo de catalizador. Además, para eliminar el agua producida por la reacción de polimerización, la reacción de polimerización se lleva a cabo de forma preferente a presión reducida y, de forma preferente, la presión no es superior a 7 kPa, de forma más preferente, no superior a 1,5 kPa.
65

Para la reacción de polimerización, se puede utilizar un compuesto que tiene dos o más grupos hidroxilo o grupos amino en la molécula como un iniciador de polimerización. Entre los ejemplos del compuesto a utilizar como un iniciador de polimerización, que tiene dos o más grupos hidroxilo o amino en la molécula, se incluyen polioles tales como etilenglicol, propilenglicol, butanodiol, hexanodiol, octanodiol, neopentilglicol, dietilenglicol, trietilenglicol, polietilenglicol, polipropilenglicol, glicerina, trimetilolpropano, pentaeritritol, dipentaeritritol, tripentaeritritol, sorbitol, alcohol polivinílico, poli(metacrilato de hidroxietilo) y poli(metacrilato de hidroxipropilo); y aminas polivalentes tales como etilendiamina, propilendiamina, butanodiamina, hexanodiamina, dietilentriamina y melamina; entre los cuales son más preferentes los polioles.

La cantidad de iniciador de polimerización a añadir no está restringida y, de forma preferente, se añaden de 0,001 a 5 partes en peso, de forma más preferente de 0,01 a 3 partes en peso con respecto a 100 partes en peso de la materia prima utilizada (ácido L-láctico, ácido D-láctico, L,L-lactida o D,D-lactida).

En los casos en los que el ácido poliláctico se produce por el procedimiento de polimerización directa, el ácido láctico utilizado como materia prima debe ser altamente puro, y la solución acuosa de ácido láctico al 90 %, de la presente invención, se puede aplicar de manera suficiente al procedimiento de polimerización directa. El disolvente utilizado para el procedimiento de polimerización directa no está restringido, siempre que no afecte negativamente a la polimerización, y puede ser agua o un disolvente orgánico. Entre los ejemplos del disolvente orgánico se incluyen hidrocarburos aromáticos. Entre los ejemplos de los hidrocarburos aromáticos incluyen tolueno, xileno, naftaleno, clorobenceno y difeniléter. En los casos en los que el ácido poliláctico se produce mediante el procedimiento de polimerización directa, al eliminar el agua producida por la reacción de condensación al exterior del sistema, se puede promover la polimerización. El procedimiento de eliminación al exterior del sistema es, de forma preferente, polimerización a presión reducida y, de forma preferente, la presión no es superior a 7 kPa, de forma más preferente, no superior a 1,5 kPa.

El ácido poliláctico tiene característicamente un peso molecular promedio en peso no inferior a 120.000, una tasa de pérdida de peso térmica inferior al 6,5 % en una atmósfera de nitrógeno a una temperatura constante de 200 °C con un tiempo de calentamiento de 20 minutos y, de forma preferente, un número de color en unidades APHA no superior a 15. En los casos en los que el peso molecular promedio en peso del ácido poliláctico no es inferior a 120.000, de forma preferente no inferior a 140.000, el ácido poliláctico tiene una excelente resistencia mecánica; en los casos en los que la tasa de pérdida de peso térmico es inferior al 6,5 %, de forma preferente no superior al 6,0 %, el ácido poliláctico tiene una excelente estabilidad térmica; y en los casos en los que APHA no es superior a 15, de forma preferente, no superior a 10, el ácido poliláctico tiene un tonalidad excelente; de modo que el ácido poliláctico que satisface estas propiedades físicas es adecuado para diversas utilidades, tales como fibras, películas y artículos moldeados.

EJEMPLOS

A continuación, la presente invención se describirá con más detalle con referencia a los ejemplos siguientes.

Como un microorganismo que tenía una capacidad de fermentación de ácido L-láctico, se utilizó *Saccharomyces cerevisiae* en el que se había introducido en el cromosoma un gen de L-lactato deshidrogenasa (gen L-LDH) derivado de *Xenopus laevis* que tenía la secuencia de bases mostrada en la SEQ ID NO: 1.

(Ejemplo de referencia 1) Preparación de cepa de levadura que tenía capacidad de fermentación de ácido L-láctico

Se utilizó una cepa cultivada a partir de la cepa B3 descrita en la Patente JP 2008-029329 A como cepa de levadura que tenía una capacidad de fermentación de ácido L-láctico. El procedimiento de reproducción se describe a continuación.

Para la cepa B3, el gen L-LDH que se muestra en la SEQ ID NO: 1 se introdujo en el locus SED1. Para la introducción al locus SED1, se llevó a cabo la PCR utilizando pTRS102 descrito en la Patente JP 2008-029329 A como plantilla de amplificación y oligonucleótidos (SEQ ID NO: 2 y 3) como un conjunto de cebadores, para amplificar un fragmento de PCR de 1,3 kb que contenía el gen L-LDH derivado de *Xenopus laevis* y la secuencia del terminador TDH3. En el presente ejemplo, la SEQ ID NO:2 se diseñó de tal manera que se añadió la secuencia correspondiente a la secuencia de 60 pb en el sentido 5' del codón de iniciación del gen SED1.

Posteriormente, mediante PCR utilizando el plásmido pRS423 como plantilla de amplificación, y oligonucleótidos (SEQ ID NO: 4 y 5) como un conjunto de cebadores, se amplificó un fragmento de PCR de aproximadamente 1,3 kb que contenía el gen HIS3, que es un marcador de selección de levadura. En el presente ejemplo, la SEQ ID NO:5 se diseñó de tal manera que se añadió la secuencia correspondiente a la secuencia de 60 pb en el sentido 3' del codón de terminación del gen SED1.

Cada fragmento de ADN se separó por electroforesis en gel de agarosa al 1 % y se purificó según un procedimiento convencional. La PCR se llevó a cabo utilizando una mezcla de los dos tipos de fragmentos obtenidos de aproximadamente 1,3 kb como plantilla de amplificación, y oligonucleótidos (SEQ ID NO: 2 y 5) como un conjunto de

cebadores, para amplificar un fragmento de PCR de, aproximadamente, 2,6 kb en el que están unidos el gen L-LDH derivado de *Xenopus laevis*, el terminador TDH3 y el gen HIS3 y se añadieron las secuencias correspondientes a las secuencias de 60 pb en el sentido de 5' en el sentido de 3' del gen SED1 a los extremos 5' y 3', respectivamente.

5 El fragmento de ADN anterior se separó por electroforesis en gel de agarosa al 1 % y se purificó según un procedimiento convencional. La cepa B3 se transformó con el fragmento de ADN y se cultivó en un medio libre de histidina, para seleccionar un transformante en el que el gen de L-LDH derivado de *Xenopus laevis* se introdujo en el cromosoma en el sentido de 3' del promotor del gen SED1.

10 La confirmación del hecho de que el transformante obtenido de este modo es la levadura que tiene el gen L-LDH derivado de *Xenopus laevis* introducido en el sentido de 3' del promotor del gen SED1 en el cromosoma se realizó de la siguiente manera. El ADN genómico del transformante se preparó utilizando el kit de extracción de ADN genómico Dr. GenTLE (fabricado por TAKARA BIO INC.), y posteriormente se llevó a cabo la PCR utilizando el ADN genómico preparado como plantilla de amplificación y oligonucleótidos (SEQ ID NO: 6 y 7) como un conjunto de
15 cebadores, para confirmar si se obtuvo un fragmento de ADN amplificado de aproximadamente 2,9 kb. En la cepa no transformada, se obtiene un fragmento de ADN amplificado de aproximadamente 1,4 kb mediante la PCR anterior. El transformante que tiene el gen L-LDH derivado de *Xenopus laevis* introducido en el cromosoma en el sentido de 3' del promotor del gen SED1 se denomina en lo sucesivo cepa B4.

20 Posteriormente, la cepa de levadura SW015 descrita en la Patente JP 2008-48726 A, que tiene una mutación sensible a la temperatura en el gen *pd5*, se cruzó con la cepa B4 obtenida tal como se ha descrito anteriormente, para obtener células diploides. Las células diploides se cultivaron en un medio de formación de ascas para permitir la formación de ascas. Se diseccionaron las ascas utilizando un micromanipulador para obtener las respectivas células haploides, que posteriormente se estudiaron por auxotrofia. Entre las células haploides obtenidas, se obtuvo
25 una cepa con el gen L-LDH derivado de *Xenopus laevis*, que se inserta en los loci PDC1, SED1 y TDH3, y se obtuvo la mutación sensible a la temperatura en el gen PDC5 (no viable a 34 °C), y se seleccionaron los respectivos tipos de apareamiento MAT α y MATa. Entre las cepas de levadura obtenidas, la que tenía el tipo de apareamiento de MATa se denominó cepa SU014-8A, y la que tenía el tipo de apareamiento de MAT α se denominó cepa SU014-3B.

30 Posteriormente, se restauró la auxotrofia de lisina de la cepa SU014-8A. utilizando el ADN genómico de BY4741 fabricado por Funakoshi Corporation como plantilla, y los oligonucleótidos (SEC ID NO: 8 y 9) como un conjunto de cebadores, se llevó a cabo una PCR para amplificar un fragmento de PCR de, aproximadamente, 2 kb correspondiente a la primera mitad del gen LYS2. El fragmento de PCR anterior se separó por electroforesis en gel de agarosa al 1 % y se purificó según un procedimiento convencional. La cepa SU014-8A se transformó con el
35 fragmento de PCR, para cancelar la mutación ámbar del gen LYS2. Cultivando el resultante en un medio libre de lisina, se seleccionó un transformante que tenía una capacidad sintética de lisina restaurada.

La confirmación del hecho de que el transformante obtenido de este modo era levadura en la que se canceló la mutación ámbar del gen LYS2 se realizó tal como sigue. En primer lugar, el transformante obtenido se cruzó con la
40 cepa 20GY77 que tenía el gen LYS2 de tipo salvaje, para obtener células diploides. Las células diploides se cultivaron en un medio de formación de ascas para permitir la formación de ascas. Se diseccionaron las ascas utilizando un micromanipulador para obtener las respectivas células haploides, que posteriormente se estudiaron por auxotrofia. Se confirmó que todas las células haploides obtenidas tenían la capacidad sintética de lisina. En los casos en los que la capacidad sintética de lisina se restauró sin cancelar la mutación de LYS2, se obtuvieron las
45 células que no tenían la capacidad sintética de lisina entre las células haploides obtenidas tal como se ha descrito anteriormente. La cepa obtenida por la restauración de la capacidad sintética de lisina de la cepa SU014-8A se denomina en lo sucesivo HI001.

Posteriormente, se restauró la auxotrofia de leucina de la cepa SU014-3B. Utilizando pRS425 como plantilla, y oligonucleótidos (SEC ID NO: 10 y 11) como un conjunto de cebadores, se llevó a cabo una PCR para amplificar un
50 fragmento de PCR del gen LEU2 de aproximadamente 2 kb. El fragmento de PCR anterior se separó por electroforesis en gel de agarosa al 1 % y se purificó según un procedimiento convencional. La cepa SU014-3B se transformó con el fragmento de PCR, para cancelar la mutación del gen LEU2. Cultivando el resultante en un medio libre de leucina, se seleccionó un transformante que tenía una capacidad sintética de leucina restaurada.

55 La confirmación del hecho de que el transformante obtenido de este modo es levadura en la que se había cancelado la mutación del gen LEU2 se llevó a cabo de la siguiente manera. En primer lugar, el transformante obtenido se cruzó con la cepa 20GY77 que tenía el gen LEU2 de tipo salvaje, para obtener células diploides. Las células diploides se cultivaron en un medio de formación de ascas para permitir la formación de ascas. Se diseccionaron ascas
60 utilizando un micromanipulador para obtener las respectivas células haploides, que posteriormente se estudiaron por auxotrofia. Se confirmó que todas las células haploides obtenidas tenían la capacidad sintética de leucina. En los casos en los que se restauró la capacidad sintética de leucina sin cancelar la mutación del gen LEU2, se obtuvieron las células que no tenían la capacidad sintética de leucina entre las células haploides obtenidas tal como se ha descrito anteriormente. La cepa obtenida por la restauración de la capacidad sintética de leucina de la cepa
65 SU014-3B se denomina en lo sucesivo HI002.

Posteriormente, la cepa HI001 y la cepa HI002 obtenidas de este modo se cruzaron entre sí para obtener una cepa protótrofa diploide, que no tenía auxotrofia. La cepa obtenida se denomina en lo sucesivo cepa HI003.

El ácido láctico se confirmó midiendo la cantidad de ácido láctico por HPLC en las siguientes condiciones.

- 5
 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
 10 Temperatura: 45 °C

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

- 15 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
 20 Temperatura: 30 °C

La pureza óptica del ácido láctico se calculó mediante la siguiente ecuación.

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

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

(Ejemplo de referencia 2) Producción de ácido L-láctico mediante fermentación por lotes

- 30 Utilizando la cepa HI003 preparada en el ejemplo de referencia 1 y un medio de materia prima de azúcar (70 g/l Yutosei (fabricado por MUSO Co., Ltd.)), se realizó una prueba de fermentación por lotes. El medio se esterilizó en autoclave (121 °C, 15 minutos) antes de su utilización. La evaluación de la concentración de ácido láctico, que es el producto, se llevó a cabo utilizando HPLC que se muestra en el ejemplo de referencia 1, y la concentración de glucosa se midió utilizando el análisis de glucosa Wako C (fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). Las condiciones de funcionamiento del aparato de fermentación por lotes del ejemplo de referencia 2 fueron las siguientes:
 35

Capacidad del fermentador (cantidad de medio de fermentación ácido-láctica), 2 (l); ajuste de temperatura, 32 (°C); volumen de ventilación para el fermentador, 0,1 (l/min); velocidad de agitación del fermentador, 200 (rpm); ajuste de pH, ajustado a pH 5 con hidróxido de calcio 1 N.

- 40 En primer lugar, se cultivó la cepa HI003 en 5 ml del medio de materia prima de azúcar en un tubo de ensayo durante la noche con agitación (precultivo previo). El medio de precultivo previo se inoculó en 100 ml de un medio de materia prima de azúcar fresco y se sometió a cultivo en un matraz Sakaguchi de 500 ml durante 24 horas con agitación (precultivo). Se llevaron a cabo ajuste de temperatura y ajuste de pH, y se realizó cultivo de fermentación.
 45 Como resultado de la fermentación por lotes durante 50 horas, la concentración de ácido láctico acumulado fue de 45 a 49 g/l, y la pureza óptica fue del 99,9 % para el ácido L-láctico.

(Ejemplo de referencia 3) Proceso de fermentación continua

- 50 Utilizando la cepa HI003 preparada en el ejemplo de referencia 1, se llevó a cabo la fermentación continua de ácido láctico con el aparato de cultivo que se muestra en la figura 1. La eliminación del permeado del recipiente de separación por membrana se realizó utilizando una bomba Masterflex. Como medio, se utilizó un medio de materia prima de azúcar (70 g/l Yutosei (fabricado por MUSO Co., Ltd.), 1,5 g/l de sulfato de amonio). Este medio de materia prima de azúcar se esterilizó en autoclave a una temperatura de 121 °C durante 15 minutos a presión elevada (2 atm) antes de su utilización. Como miembro de elemento de membrana porosa, se utilizó un artículo moldeado hecho de acero inoxidable y una resina de polisulfona y, como membrana porosa, se utilizó una membrana de fibras huecas preparada mediante el procedimiento descrito en el ejemplo de referencia 13 de la Patente WO2007/097260. Las condiciones de funcionamiento fueron las siguientes.

- 60 Capacidad de reactor de cultivo: 20 (l)
 Volumen de medio de cultivo en el reactor de cultivo: 15 (l)
 Membrana porosa utilizada: membrana de filtración de PVDF
 Área de filtración efectiva de elemento de separación por membrana: 2.800 cm²
 Ajuste de la temperatura: 32 (°C)
 65 Volumen de ventilación para el reactor de cultivo: aire, 1 (l/min)
 Velocidad de agitación del reactor de cultivo: 800 (rpm)

Ajuste de pH: ajustado a pH 5 con hidróxido de calcio 5 N

Esterilización: 121 °C, 0,2 MPa, 20 min, para todo el reactor de cultivo, incluido el elemento de membrana porosa, y el medio utilizado.

Tasa de eliminación del medio de cultivo: 0,16 m³/m²/d

5 La eliminación del medio de cultivo mediante una bomba Masterflex se inició 50 horas después del inicio del cultivo, y el cultivo se continuó hasta 500 horas después del inicio del cultivo. Los resultados de la medición de la concentración de ácido láctico, que es el producto, y la tasa de producción de ácido láctico se muestran en la figura 2. La concentración de ácido láctico se midió mediante el procedimiento que se muestra en el ejemplo de referencia 1, y la tasa de producción de ácido láctico se calculó utilizando la ecuación 7 a continuación.

$$\text{Tasa de producción de ácido láctico g/l/h} = \frac{\text{concentración de ácido láctico acumulado en el líquido extraído (g/l)} \times \text{tasa de eliminación del líquido de fermentación (l/h)}}{\text{volumen de líquido operativo del aparato (l)}} \quad (\text{Ecuación 7})$$

15 Como resultado, la diferencia de presión transmembrana no excedió 1 kPa y fue posible una operación estable, sin provocar obstrucción de la membrana. La tasa promedio de producción de ácido láctico durante el período de 50 horas a 500 horas después del inicio del cultivo fue de 6 g/l/h. El ácido láctico obtenido a partir del permeado de la membrana porosa durante el período de 400 horas a 500 horas después del inicio del cultivo se utilizó en los siguientes ejemplos (concentración de ácido láctico: 52 g/l, pureza óptica del ácido L-láctico: 99,9 %)

20 (Ejemplo de referencia 4) Evaluación de la permeabilidad del sulfato de magnesio a través de la membrana de nanofiltración

25 A 10 l de agua ultrapura, se les añadieron 10 g de sulfato de magnesio (fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) y la mezcla resultante se agitó a 25 °C durante 1 hora, para preparar una solución acuosa de 1.000 ppm de sulfato de magnesio. Posteriormente, se alimentaron 10 l de la solución acuosa de sulfato de magnesio preparada al tanque de líquido crudo 13 del aparato de filtración de membrana que se muestra en la figura 3. Como la membrana de nanofiltración 90φ indicada por el símbolo 19 en la figura 4, se colocó una membrana de nanofiltración de piperazina poliamida reticulada "UTC60" (membrana de nanofiltración 1, fabricada por TORAY INDUSTRIES, INC.), una membrana de nanofiltración de piperazina poliamida reticulada "NF-400" (membrana de nanofiltración 2, fabricada por Filmtec Corporation), una membrana de nanofiltración de poliamida "NF99" (membrana de nanofiltración 3, fabricada por Alfa-Laval) o una membrana de nanofiltración de acetato de celulosa "GEsepa" (membrana de nanofiltración 4, fabricada por GE Osmonics) en una celda de acero inoxidable (SUS316). La temperatura del líquido crudo se ajustó a 25 °C, y la presión de la bomba de presión elevada 15 se ajustó a 0,5 MPa, para recoger el permeado 16. Las concentraciones de sulfato de magnesio contenidas en el tanque de líquido crudo 13 y el permeado 16 se analizaron mediante cromatografía iónica (fabricada por Dionex Corporation) en las siguientes condiciones, calculando de este modo la tasa de permeación de sulfato de magnesio.

40 Anión; columna (AS4A-SC (fabricada por Dionex Corporation)), eluyente (carbonato de sodio 1,8 mM/hidrogenocarbonato de sodio 1,7 mM), temperatura (35 °C).

Catión; columna (CS12A (fabricada por Dionex Corporation)), eluyente (ácido metanosulfónico 20 mM), temperatura (35 °C).

45 Los resultados se muestran en la tabla 1.

[Tabla 1]

	Nombre comercial (nombre del fabricante)	Material de membrana	Presión de filtración (MPa)	Concentración de sulfato de magnesio en el líquido crudo (ppm)	Concentración de sulfato de magnesio en el permeado (ppm)	Tasa de permeación de sulfato de magnesio (%)
Membrana de nanofiltración 1	UTC60 (TORAY INDUSTRIES, INC.)	Piperazina poliamida reticulada	0,5	1.000	2	0,2
Membrana de nanofiltración 2	NF-400 (Filmtec Corporation)	Piperazina poliamida reticulada	0,5	1.000	20	2
Membrana de nanofiltración 3	NF99 (Alfa-Laval)	Poliamida	0,5	1.000	20	2
Membrana de nanofiltración 4	GEsepa (GE Osmonics)	Acetato de celulosa	0,5	1.000	30	3

(Ejemplo de referencia 5) Evaluación de la permeabilidad del ácido cítrico a través de la membrana de nanofiltración

- 5 A 10 l de agua ultrapura, se les añadieron 10 g de ácido cítrico (fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), y la mezcla resultante se agitó a 25 °C durante 1 hora, para preparar una solución acuosa de 1.000 ppm de ácido cítrico. Posteriormente, los permeados de las membranas de nanofiltración 1 a 4 se recogieron en las mismas condiciones que en el ejemplo de referencia 3. Las concentraciones de ácido cítrico contenido en el tanque de líquido crudo 13 y el permeado 16 se analizaron por cromatografía líquida de alta eficacia (fabricada por Shimadzu Corporation) en las siguientes condiciones, calculando de este modo la tasa de permeación del ácido cítrico y la tasa de permeación del ácido cítrico/tasa de permeación del sulfato de magnesio.
- 10 Columna: Shim-Pack SPR-H (fabricado por Shimadzu Corporation); fase móvil: ácido p- toluenosulfónico 5 mM (caudal: 0,8 ml/min.); solución de reacción: ácido p-toluenosulfónico 5 mM, Bis-Tris 20 mM, EDTA·2Na 0,1 mM (caudal: 0,8 ml/min); procedimiento de detección: conductividad eléctrica; temperatura: 45 °C.
- 15 Los resultados se muestran en la tabla 2.

[Tabla 2]

	Nombre comercial (nombre del fabricante)	Material de membrana	Presión de filtración (MPa)	Concentración de ácido cítrico en el líquido crudo (ppm)	Concentración de ácido cítrico en el permeado (ppm)	Tasa de permeación de ácido cítrico (%)	Tasa de permeación de ácido cítrico/tasa de permeación de sulfato de magnesio
Membrana de nanofiltración 1	UTC60 (TORAY INDUSTRIES, INC.)	Piperazina poliamida reticulada	0,5	1.000	180	18	70
Membrana de nanofiltración 2	NF-400 (Flimtec Corporation)	Piperazina poliamida reticulada	0,5	1.000	140	14	7
Membrana de nanofiltración 3	NF99 (Alfa-Laval)	Poliamida	0,5	1.000	160	16	8
Membrana de nanofiltración 4	GEsepa (GE Osmonics)	Acetato de celulosa	0,5	1.000	60	6	2

(Ejemplos de referencia 6 a 12) Prueba de permeación del medio de cultivo de fermentación ácido-láctica a través de la membrana de nanofiltración

5 A partir del medio de cultivo (2 l) obtenido como en el ejemplo de referencia 2, se eliminaron las células por centrifugación y posteriormente se añadió ácido sulfúrico concentrado (fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) gota a gota al medio de cultivo hasta un pH de 1,9 (ejemplo de referencia 6), 2,0 (ejemplo de referencia 7), 2,2 (ejemplo de referencia 8), 2,6 (ejemplos de referencia 9 a 11) o 4,0 (ejemplo de referencia 12),
10 seguido de agitación de la mezcla resultante durante 1 hora a 25 °C, convirtiendo de este modo el lactato de calcio en el medio de cultivo en ácido láctico y sulfato de calcio. Posteriormente, el sulfato de calcio precipitado se separó filtrando los precipitados utilizando papel de filtro cualitativo No. 2 (fabricado por ADVANTEC) por filtración por succión, y se recogieron 2 l del filtrado.

15 Posteriormente, se inyectaron 2 l de cada filtrado obtenido tal como se ha descrito anteriormente en el tanque de líquido crudo 13 del aparato de filtración de membrana que se muestra en la figura 3. Como la membrana de nanofiltración 90φ indicada por el símbolo 19 en la figura 4, se colocó cada una de las membranas de nanofiltración 1 a 4 en una celda de acero inoxidable (SUS316). En cada caso, la presión de la bomba de elevada presión 15 se ajustó a 4 MPa para recoger el permeado 16. Las concentraciones de los iones sulfato y los iones de calcio contenidos en el tanque de líquido crudo 13 y el permeado 16 se analizaron por cromatografía iónica (fabricado por Dionex Corporation) en las mismas condiciones que en el ejemplo de referencia 4, y la concentración de ácido láctico se analizó mediante cromatografía líquida de alta eficacia (fabricada por Shimadzu Corporation) en las
20 mismas condiciones que en el ejemplo de referencia 1. Los resultados se muestran en la tabla 3.

[Tabla 3]

	Membrana de nanofiltración	pH	Flujo de permeación de membrana (m ³ /m ² /día)	Concentración de ion calcio			Concentración de ion sulfato			Concentración de ácido láctico		
				Líquido crudo (mg/l)	Líquido permeado (mg/l)	Tasa de eliminación (%)	Líquido crudo (mg/l)	Líquido permeado (mg/l)	Tasa de eliminación (%)	Líquido crudo (mg/l)	Líquido permeado (mg/l)	Tasa de eliminación (%)
Ejemplo de referencia 5	1	1,9	2,54	557	0,8	99,9	1.678	428	74,5	45	22,9	50,9
Ejemplo de referencia 6	1	2	2,54	557	0,8	99,9	1.678	428,3	74,5	45	22,9	50,9
Ejemplo de referencia 7	1	2,2	2,5	811	0,8	99,9	1.165	133	88,6	48	24,5	51
Ejemplo de referencia 8	1	2,6	2,5	1.497	1,3	99,9	918	24	97,4	48	24,9	51,9
Ejemplo de referencia 9	2	2,6	2,12	1.497	4,8	99,7	918	26,8	97,1	48	21,2	44,2
Ejemplo de referencia 10	3	2,6	2,08	1.497	6,7	99,6	918	24,3	97,4	48	21,9	45,6
Ejemplo de referencia 11	4	2,6	1,48	1.497	2,1	99,9	918	1,8	99,8	48	21	43,8
Ejemplo de referencia 12	1	4	2,51	4.909	2,9	99,9	402	7,9	98	49	20,9	42,7

Tal como se muestra en la tabla 3, se desveló que el sulfato de calcio se eliminó con elevada eficiencia a todos los pH. Se desveló además que la tasa de permeación del ácido láctico y el flujo de permeación de la membrana eran más elevados con la membrana de nanofiltración 1.

5 (Ejemplos 1 a 5) Ejemplos de producción de ácido láctico

10 A 200 l del permeado de una membrana porosa, que se obtuvieron en el ejemplo de referencia 3, se les añadió ácido sulfúrico concentrado (fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) gota a gota a un pH de 1,9 (ejemplo 1), 2,0 (ejemplo 2), 2,2 (ejemplo 3), 2,6 (ejemplo 4) o 4,0 (ejemplo 5), seguido de agitación de la mezcla resultante durante 1 hora a 25 °C, convirtiendo de este modo el lactato de calcio en el medio de cultivo en ácido láctico y sulfato de calcio. Posteriormente, el sulfato de calcio precipitado se separó filtrando los precipitados utilizando papel de filtro cualitativo por filtración por succión, y se recogieron 200 l de cada uno de los filtrados.

15 Posteriormente, se inyectaron 200 l de cada filtrado obtenido en los ejemplos anteriores en el tanque de líquido crudo 13 del aparato de filtración de membrana que se muestra en la figura 3. El módulo de nanofiltración 2 de 4 pulgadas ("UTC60" fabricado por TORAY INDUSTRIES, INC.) de la membrana de nanofiltración 1, que mostró las mayores tasas de permeación de ácido láctico en los ejemplos de referencia 6 a 12, se colocó en un recipiente especial, y se llevó a cabo la operación ajustando la presión de la bomba de presión elevada de 15 a 4 MPa, para recoger el permeado a cada pH. Se analizaron las concentraciones de los iones de ácido sulfúrico y los iones de calcio contenidos en el tanque de líquido crudo 13 y el permeado 16 por cromatografía iónica (fabricada por Dionex Corporation) en las mismas condiciones que en el ejemplo de referencia 4, y se analizó la concentración de ácido láctico por cromatografía líquida de alta eficacia (fabricada por Shimadzu Corporation) en las mismas condiciones que en el ejemplo de referencia 1. Como resultado, se desveló que el sulfato de calcio se eliminó con elevada eficiencia a todos los pH, como en los ejemplos de referencia 6 a 12.

25 A continuación, se concentraron 100 l de cada permeado de la membrana de nanofiltración por destilación de agua utilizando un destilador instantáneo (fabricado por TOKYO RIKAKIKAI) a presión reducida (50 hPa). En este momento, no se observó depósito de sulfato de calcio.

30 A continuación, se llevó a cabo destilación a una presión reducida de 133 Pa a 130 °C. Para confirmar la racemización del ácido láctico destilado, se midió la pureza óptica antes y después de la destilación, mediante cromatografía líquida de alta eficacia. Los resultados se muestran en la tabla 4.

35 El ácido láctico purificado obtenido se utilizó para la prueba de polimerización directa en el ejemplo 6 y la prueba de síntesis de lactida en el ejemplo 7, y el ácido láctico antes de la destilación para la prueba de polimerización directa en ejemplo comparativo 2 y la prueba de síntesis de lactida en el ejemplo comparativo 3.

(Ejemplo comparativo 1) Ejemplo de producción de ácido láctico

40 A 200 l del permeado de membrana obtenido como en el ejemplo de referencia 3, se les añadió ácido sulfúrico concentrado (fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) gota a gota a un pH de 2,0, seguido de agitación de la mezcla resultante durante 1 hora a 25 °C, convirtiendo de este modo el lactato de calcio en el medio de cultivo en ácido láctico y sulfato de calcio. Posteriormente, el sulfato de calcio precipitado se separó filtrando precipitados utilizando papel de filtro cualitativo mediante filtración por succión, y se recogieron 200 l del filtrado. Se analizó la concentración de sulfato de calcio contenido en el filtrado por cromatografía iónica, y se desveló que la concentración era de 549 mg/l. De este modo, se desveló que el sulfato de calcio no se había eliminado lo suficiente.

50 Posteriormente, se concentraron 100 l del filtrado mediante destilación de agua utilizando un destilador instantáneo a presión reducida (50 hPa), y esto provocó el depósito de sulfato de calcio que no había sido eliminado por el papel de filtro de calidad descrito anteriormente. Posteriormente, la destilación se llevó a cabo a presión reducida a 133 Pa, a 130 °C. Para confirmar la racemización del ácido láctico destilado, se midió la pureza óptica del ácido láctico antes y después de la destilación, mediante cromatografía líquida de alta eficacia en las mismas condiciones que en el ejemplo de referencia 1. Como resultado, se observó una disminución en la pureza óptica. Además, en el residuo de destilación, se observó ácido láctico parcialmente oligomerizado, y el rendimiento de destilación disminuyó al 30 %.

55 Estos resultados se muestran en la tabla 4, junto con los resultados de la purificación a través de la membrana de nanofiltración.

[Tabla 4]

	Pureza óptica (%)		Rendimiento de destilación (%)
	Antes de la destilación	Después de la destilación	
Ejemplo 1	99,9	99,9	60
Ejemplo 2	99,9	99,9	81
Ejemplo 3	99,9	99,9	84
Ejemplo 4	99,9	99,9	88
Ejemplo 5	99,9	99,9	92
Ejemplo comparativo 1	99,9	94,0	30

(Ejemplo 6) Prueba de polimerización directa para ácido láctico

5 En un recipiente de reacción que tenía un agitador, se calentaron 150 g del ácido láctico obtenido en el ejemplo 2 a 800 Pa a 160 °C durante 3,5 horas, para obtener oligómeros. Posteriormente, se añadieron 0,12 g de acetato de estaño (II) (fabricado por Kanto Chemical Co., Ltd.) y 0,33 g de ácido metanosulfónico (fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) a los oligómeros, y la mezcla resultante se calentó a 500 Pa a 180 °C durante 7 horas, para obtener un prepolímero. El prepolímero se cristalizó posteriormente calentándolo en un horno a 120 °C durante 2 horas. El prepolímero obtenido se pulverizó utilizando un molino de martillos, y se hizo pasar a través de un tamiz, para obtener un material pulverulento que tenía un tamaño promedio de partícula de 0,1 mm. En la etapa de polimerización en fase sólida, se tomaron 150 g del prepolímero y se introdujeron en un horno al que se conectó una bomba rotativa de aceite, realizando de ese modo un tratamiento térmico al vacío. La presión se ajustó a 50 Pa, y la temperatura de calentamiento se ajustó a: 140 °C durante 10 horas; 150 °C durante 10 horas; y 160 °C durante 20 horas. El ácido poliláctico obtenido se sometió a análisis de peso molecular promedio en peso con GPC (fabricado por Tosoh Corporation), análisis de punto de fusión con DSC (fabricado por SII NanoTechnology Inc.) y análisis de la tasa de pérdida de peso térmica con TG (fabricada por SII NanoTechnology Inc.).

20 (Análisis de peso molecular promedio en peso del ácido poliláctico)

El peso molecular promedio en peso (Mw) del ácido poliláctico producido mediante la polimerización es un valor del peso molecular promedio en peso en términos del patrón de metacrilato de polimetilo medido por cromatografía de permeación en gel (GPC). La medición de GPC se llevó a cabo utilizando HLC8320GPC (fabricado por Tosoh Corporation) como sistema de GPC, y dos columnas TSK-GEL SuperHM-M (fabricadas por Tosoh Corporation) en serie. La detección se realizó utilizando un refractómetro diferencial. En términos de las condiciones para la medición, el caudal fue de 0,35 ml/min., se utilizó hexafluoroisopropanol como disolvente y se inyectaron 0,02 ml de una solución con una concentración de muestra de 1 mg/ml.

30 (Análisis del punto de fusión del ácido poliláctico)

El punto de fusión del ácido poliláctico producido mediante la polimerización es un valor medido con el calorímetro diferencial de barrido DSC7020 (fabricado por SII NanoTechnology Inc.), y la medición se realizó con 10 mg de una muestra, en atmósfera de nitrógeno a una velocidad de calentamiento de 20 °C/min.

35 (Análisis de la tasa de pérdida de peso térmica del ácido poliláctico)

La tasa de pérdida de peso térmica del ácido poliláctico producido mediante la polimerización se midió utilizando el analizador térmico diferencial de gravimetría térmica TG/DTA7200 (fabricado por SII NanoTechnology Inc.). La medición se realizó con 10 mg de una muestra, en atmósfera de nitrógeno a una temperatura constante de 200 °C durante un tiempo de calentamiento de 20 minutos.

(Análisis del grado de coloración del ácido poliláctico)

45 En 9,5 g de cloroformo, se disolvieron 0,5 g del ácido poliláctico producido mediante la polimerización, y el grado de coloración se analizó utilizando un colorímetro (fabricado por NIPPON DENSHOKU INDUSTRIES CO., LTD.) como número de color en unidades APHA.

50 El ácido poliláctico obtenido mediante polimerización directa de ácido láctico tenía un peso molecular promedio en peso de 155.000, un punto de fusión de 165 °C, una tasa de pérdida de peso térmica del 5 % y un grado de coloración APHA de 10.

(Ejemplo comparativo 2) Prueba de polimerización directa de ácido láctico

55 Se concentró el ácido láctico antes de la destilación en el ejemplo 2 con un evaporador rotatorio al 90 % en peso, para obtener 150 g de ácido láctico concentrado. La polimerización directa se llevó a cabo en las mismas

condiciones que en el ejemplo 6. El ácido poliláctico obtenido mediante polimerización directa tenía un peso molecular promedio en peso de 85.000, un punto de fusión de 160 °C, una tasa de pérdida de peso térmico del 15 % y un grado de coloración APHA 50. Por lo tanto, la calidad del ácido láctico fue peor que la del ácido láctico obtenido en el ejemplo 6, para todos los aspectos de evaluación.

5

(Ejemplo 7) Prueba de síntesis de lactida

En un recipiente de reacción que tenía un agitador, se concentraron 150 g del ácido láctico obtenido en el ejemplo 2 calentando a presión atmosférica a 135 °C durante 30 minutos. Posteriormente, a presión reducida (4.500 a 6.500 Pa), se aumentó la temperatura del líquido de manera gradual a 135 °C (20 minutos), 150 °C (20 minutos) y 160 °C (20 minutos), para obtener oligómeros. Posteriormente, se añadieron 0,75 g de octilato de estaño (II) (Nacalai Tesque) a los oligómeros, y se realizó una destilación simple a presión reducida (1.000 a 2.000 Pa) a 200 °C durante 2 horas, para destilar lactida. Para evitar la obstrucción de las tuberías, la temperatura del condensador se ajustó a 110 °C. Se obtuvo una fracción de lactida en una cantidad de 92,3 g. El rendimiento de lactida fue del 85,4 % basado en el ácido L-láctico de partida.

10

15

(Análisis de la pureza química de la lactida)

La pureza química de la lactida sintetizada (proporción de LL-lactida en la lactida recuperada) se analizó con la cromatografía de gases GC2010 (fabricada por Shimadzu Corporation). Como columna, se utilizó la columna capilar RT BDEXM (fabricada por RESTEK), y las condiciones de medición fueron: caudal de gas portador (He), 69,2 ml/min; temperatura de la cámara de vaporización, 230 °C; temperatura de columna, 150 °C; temperatura del detector (FID), 230 °C; y proporción de división, 50. A partir de las proporciones de área de pico de LL-lactida, DD-lactida y DL-lactida, se calculó la pureza química de LL-lactida.

20

25

(Análisis del grado de coloración de la lactida)

Se disolvieron por completo 6 g de la lactida sintetizada en 20 g de acetona, y se analizó el grado de coloración utilizando un colorímetro (fabricado por NIPPON DENSHOKU INDUSTRIES CO., LTD.) como un número de color en unidades APHA.

30

Como resultado, la lactida obtenida tenía una pureza química del 96,2 % y un grado de coloración APHA de 2.

35

(Ejemplo comparativo 3) Prueba de síntesis de lactida

Se concentró el ácido láctico antes de la destilación en el ejemplo 2 con un evaporador rotatorio al 90 % en peso, para obtener 150 g de ácido láctico concentrado. La lactida se sintetizó en las mismas condiciones que en el ejemplo 7. Se obtuvo lactida en una cantidad de 79,1 g con un rendimiento del 73,2 %, y tenía una pureza química del 93,1 % y un grado de coloración APHA de 12. Por lo tanto, tanto el rendimiento como la calidad del ácido láctico fueron peores que los del ácido láctico obtenido por el ejemplo 7.

40

(Ejemplo 8) Producción de ácido poliláctico mediante polimerización utilizando lactida como materia prima, y evaluación de las propiedades físicas del ácido poliláctico

En un recipiente de reacción que tenía un agitador, se alimentaron 50 g de la lactida obtenida en el ejemplo 7 y 0,05 g de alcohol estearílico, y la atmósfera dentro del sistema se reemplazó con nitrógeno, seguido de calentamiento de la mezcla resultante a 190 °C para disolver la lactida. Posteriormente, se añadieron 0,025 g de octilato de estaño (II) al mismo, y la polimerización se llevó a cabo a 190 °C durante 2 horas. El ácido poliláctico obtenido se analizó para determinar su peso molecular promedio en peso, punto de fusión, tasa de pérdida de peso térmica y grado de coloración mediante los procedimientos descritos en el ejemplo 6. El peso molecular promedio en peso fue de 135.000; el punto de fusión fue de 165 °C; la tasa de pérdida de peso térmica fue del 5,1 %; y el grado de coloración APHA fue de 5.

45

50

(Ejemplo comparativo 4) Producción de ácido poliláctico mediante polimerización utilizando lactida como materia prima, y evaluación de las propiedades físicas del ácido poliláctico

55

Se produjo ácido poliláctico mediante polimerización de lactida por el mismo procedimiento que en el ejemplo 8, excepto en que se utilizaron 50 g de la lactida obtenida en el ejemplo comparativo 3. El ácido poliláctico obtenido tenía un peso molecular promedio en peso de 109.000, un punto de fusión de 162 °C, una tasa de pérdida de peso del 6,3 % y un grado de coloración de APHA de 11. Por lo tanto, la calidad del ácido poliláctico fue peor que la del ácido poliláctico obtenido por el ejemplo 8, para todos los aspectos de evaluación.

60

(Ejemplo 9) Análisis de impurezas en el ácido láctico

Se filtraron tres litros de filtrado obtenidos de la misma manera que en el ejemplo 3 a través del módulo de membrana de nanofiltración SU-610 (fabricado por TORAY INDUSTRIES, INC.) a una presión de funcionamiento de

65

2,0 MPa, para eliminar impurezas. Se concentró la solución acuosa de ácido láctico que había permeado a través del módulo de membrana de nanofiltración utilizando el módulo de membrana de ósmosis inversa SU-810 (fabricado por TORAY INDUSTRIES, INC.), y se concentró aún más por destilación de agua utilizando un evaporador rotativo (fabricado por TOKYO RIKAKIKAI) a presión reducida (50 hPa), obteniendo de este modo una solución acuosa de ácido láctico al 80 %. Posteriormente, la destilación se llevó a cabo a una presión reducida de 133 Pa a 133 °C, para obtener 500 g de ácido láctico.

(Análisis de impurezas en el ácido láctico)

Al ácido láctico obtenido tal como se ha descrito anteriormente, se le añadió agua pura para preparar una solución acuosa de ácido láctico al 90 %. Las impurezas contenidas se analizaron por HPLC (cromatografía líquida de alta eficacia) o GC (cromatografía de gases) en las siguientes condiciones. Los resultados del análisis se muestran en la tabla 5.

(Análisis de ácido acético, ácido pirúvico y ácido 2-hidroxibutírico por HPLC).

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.

(Análisis de furfural y HMF por HPLC).

Columna: Synergie HydroRP (fabricada por Phenomenex, Inc.); fase móvil: solución acuosa de acetonitrilo al 5 % (caudal 1,0 ml/min.); procedimiento de detección: UV (283 nm); temperatura: 40 °C.

(Análisis de metanol y lactato de metilo por procedimiento de GC)

Columna: DB-5 (0,25 mm × 30 m, fabricada por J&W); temperatura de la columna: 50 °C a 250 °C (8 °C/min.); temperatura de entrada: 250 °C; gas portador: helio; presión portadora: 65 kPa.

Tal como se muestra en la tabla 5, las concentraciones de todas las impurezas distintas del ácido acético y el ácido pirúvico fueron 0 ppm (por debajo del límite de detección).

[Tabla 5]

Nombre de la impureza	Contenido en ácido láctico al 90 %
Metanol	0 ppm
Ácido acético	200 ppm
Ácido pirúvico	200 ppm
Ácido 2-hidroxibutírico	0 ppm
Furfural	0 ppm
5-Hidroximetil-furfural	0 ppm
Lactato de metilo	0 ppm

(Ejemplo 10) Prueba de polimerización directa de ácido láctico, y evaluación de las propiedades físicas del ácido poliláctico

En un recipiente de reacción que tenía un agitador, se calentaron 150 g de la solución acuosa de ácido láctico al 90 % en el ejemplo 9 a 800 Pa a 160 °C durante 3,5 horas, para obtener oligómeros. Posteriormente, se añadieron 0,12 g de acetato de estaño (II) (fabricado por Kanto Chemical Co., Ltd.) y 0,33 g de ácido metanosulfónico (fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) a los oligómeros, y la mezcla resultante se calentó a 500 Pa a 180 °C durante 7 horas, para obtener un prepolímero. El prepolímero se cristalizó posteriormente calentándolo en un horno a 120 °C durante 2 horas. El prepolímero obtenido se pulverizó utilizando un molino de martillos, y se hizo pasar a través de un tamiz, para obtener un material pulverulento que tenía un tamaño promedio de partícula de 0,1 mm. En la etapa de polimerización en fase sólida, se tomaron 150 g del prepolímero y se introdujeron en un horno al que se conectó una bomba rotativa de aceite, realizando de ese modo un tratamiento térmico al vacío. La presión se ajustó a 50 Pa, y la temperatura de calentamiento se ajustó a: 140 °C durante 10 horas; 150 °C durante 10 horas; y 160 °C durante 20 horas. Se analizaron el peso molecular promedio en peso, el punto de fusión, la tasa de pérdida de peso térmico y el grado de coloración del ácido poliláctico obtenido mediante los procedimientos descritos en el ejemplo 6.

(Ejemplo 11) Análisis de impurezas en el ácido láctico, prueba de polimerización directa de ácido láctico y evaluación de las propiedades físicas del ácido poliláctico

Se produjo ácido poliláctico mediante polimerización y se analizó de la misma manera que en el ejemplo 10, excepto en que se utilizaron 150 g de una solución acuosa de ácido láctico, solución acuosa de ácido láctico que se preparó

añadiendo al ácido láctico obtenido en el ejemplo 9 los componentes respectivos, entre las impurezas contenidas en la solución acuosa de ácido láctico al 90 % obtenida en el ejemplo 9, de modo que sus concentraciones se ajustaron a 30 ppm de metanol, 100 ppm de ácido fórmico, 200 ppm de ácido pirúvico, 100 ppm de ácido 2-hidroxibutírico, 3 ppm de furfural, 2 ppm de 5-hidroximetilfurfural y 100 ppm de lactato de metilo.

5 (Ejemplo de referencia 12¹) Análisis de impurezas en el ácido láctico, prueba de polimerización directa de ácido láctico y evaluación de propiedades físicas del ácido poliláctico

¹fuera del alcance de las reivindicaciones

10 Se produjo ácido poliláctico mediante polimerización y se analizó de la misma manera que en el ejemplo 10, excepto en que se utilizaron 150 g de una solución acuosa de ácido láctico, solución acuosa de ácido láctico que se preparó añadiendo al ácido láctico obtenido en el ejemplo 9 los componentes respectivos, entre las impurezas contenidas en la solución acuosa de ácido láctico al 90 % obtenida en el ejemplo 9, de modo que sus concentraciones se ajustaron a 65 ppm de metanol, 100 ppm de ácido fórmico, 300 ppm de ácido acético, 300 ppm de ácido pirúvico, 150 ppm de ácido 2-hidroxibutírico, 5 ppm de furfural, 5 ppm de 5-hidroximetilfurfural y 350 ppm de lactato de metilo.

15 (Ejemplo comparativo 5) Análisis de impurezas en el ácido láctico y evaluación de las propiedades físicas del ácido poliláctico

20 Se produjo ácido poliláctico mediante polimerización y se analizó de la misma manera que en el ejemplo 10, excepto en que se utilizaron 150 g de una solución acuosa de ácido láctico, solución acuosa de ácido láctico que se preparó añadiendo al ácido láctico obtenido en el ejemplo 9 los componentes respectivos, entre las impurezas contenidas en la solución acuosa de ácido láctico al 90 % obtenida en el ejemplo 9, de modo que sus concentraciones se ajustaron a 100 ppm de metanol, 100 ppm de ácido fórmico, 300 ppm de ácido acético, 300 ppm de ácido pirúvico, 150 ppm de ácido 2-hidroxibutírico, 5 ppm de furfural, 5 ppm de 5-hidroximetilfurfural y 350 ppm de lactato de metilo.

25 (Ejemplo comparativo 6) Análisis de impurezas en el ácido láctico, prueba de polimerización directa de ácido láctico y evaluación de propiedades físicas del ácido poliláctico

30 Se produjo ácido poliláctico mediante polimerización y se analizó de la misma manera que en el ejemplo 10, excepto en que se utilizaron 150 g de una solución acuosa de ácido láctico, solución acuosa de ácido láctico que se preparó añadiendo al ácido láctico obtenido en el ejemplo 9 los componentes respectivos, entre las impurezas contenidas en la solución acuosa de ácido láctico al 90 % obtenida en el ejemplo 9, de modo que sus concentraciones se ajustaron a 65 ppm de metanol, 100 ppm de ácido fórmico, 300 ppm de ácido acético, 600 ppm de ácido pirúvico, 150 ppm de ácido 2-hidroxibutírico, 5 ppm de furfural, 5 ppm de 5-hidroximetilfurfural y 350 ppm de lactato de metilo.

35 (Ejemplo comparativo 7) Análisis de impurezas en el ácido láctico, prueba de polimerización directa del ácido láctico y evaluación de las propiedades físicas del ácido poliláctico

40 Se produjo ácido poliláctico mediante polimerización y se analizó de la misma manera que en el ejemplo 10, excepto en que se utilizaron 150 g de una solución acuosa de ácido láctico, solución acuosa de ácido láctico que se preparó añadiendo al ácido láctico obtenido en el ejemplo 9 los componentes respectivos, entre las impurezas contenidas en la solución acuosa de ácido láctico al 90 % obtenida en el ejemplo 9, de modo que sus concentraciones se ajustaron a 65 ppm de metanol, 100 ppm de ácido fórmico, 300 ppm de ácido acético, 300 ppm de ácido pirúvico, 150 ppm de ácido 2-hidroxibutírico, 5 ppm de furfural, 25 ppm de 5-hidroximetilfurfural y 350 ppm de lactato de metilo.

45 (Ejemplo comparativo 8) Análisis de impurezas en el ácido láctico, prueba de polimerización directa del ácido láctico y evaluación de las propiedades físicas del ácido poliláctico

50 Se produjo ácido poliláctico mediante polimerización y se analizó de la misma manera que en el ejemplo 10, excepto en que se utilizaron 150 g de una solución acuosa de ácido láctico, solución acuosa de ácido láctico que se preparó añadiendo al ácido láctico obtenido en el ejemplo 9 los componentes respectivos, entre las impurezas contenidas en la solución acuosa de ácido láctico al 90 % obtenida en el ejemplo 9, de modo que sus concentraciones se ajustaron a 65 ppm de metanol, 100 ppm de ácido fórmico, 300 ppm de ácido acético, 300 ppm de ácido pirúvico, 150 ppm de ácido 2-hidroxibutírico, 25 ppm de furfural, 5 ppm de 5-hidroximetilfurfural y 350 ppm de lactato de metilo.

55 (Ejemplo comparativo 9) Análisis de impurezas en el ácido láctico, prueba de polimerización directa de ácido láctico y evaluación de las propiedades físicas del ácido poliláctico

60 Se produjo ácido poliláctico mediante polimerización y se analizó de la misma manera que en el ejemplo 10, excepto en que se utilizaron 150 g de una solución acuosa de ácido láctico, solución acuosa de ácido láctico que se preparó añadiendo al ácido láctico obtenido en el ejemplo 9 los componentes respectivos, entre las impurezas contenidas en la solución acuosa de ácido láctico al 90 % obtenida en el ejemplo 9, de modo que sus concentraciones se ajustaron a 65 ppm de metanol, 100 ppm de ácido fórmico, 300 ppm de ácido acético, 300 ppm de ácido pirúvico, 150 ppm de ácido 2-hidroxibutírico, 5 ppm de furfural, 5 ppm de 5-hidroximetilfurfural y 650 ppm de lactato de metilo.

65

(Ejemplo comparativo 10) Análisis de impurezas en el ácido láctico, prueba de polimerización directa de ácido láctico y evaluación de las propiedades físicas del ácido poliláctico

5 Se produjo ácido poliláctico mediante polimerización y se analizó de la misma manera que en el ejemplo 10, excepto en que se utilizaron 150 g de una solución acuosa de ácido láctico, solución acuosa de ácido láctico que se preparó añadiendo al ácido láctico obtenido en el ejemplo 9 los componentes respectivos, entre las impurezas contenidas en la solución acuosa de ácido láctico al 90 % obtenida en el ejemplo 9, de modo que sus concentraciones se ajustaron a 70 ppm de metanol, 750 ppm de ácido 2-hidroxi-butírico y 500 ppm de lactato de metilo.

10 (Ejemplo comparativo 11) Análisis de impurezas en el ácido láctico, prueba de polimerización directa de ácido láctico y evaluación de las propiedades físicas del ácido poliláctico

15 Se produjo ácido poliláctico mediante polimerización y se analizó de la misma manera que en el ejemplo 10, excepto en que se utilizaron 150 g de una solución acuosa de ácido láctico, solución acuosa de ácido láctico que se preparó añadiendo al ácido láctico obtenido en el ejemplo 9 los componentes respectivos, entre las impurezas contenidas en la solución acuosa de ácido láctico al 90 % obtenida en el ejemplo 9, de modo que sus concentraciones se ajustaron a 600 ppm de ácido acético y 300 ppm de ácido pirúvico.

20 En la tabla 6 se muestran los pesos moleculares promedio en peso, los puntos de fusión, las tasas de pérdida de peso térmico y los grados de coloración APHA de los ácidos polilácticos obtenidos en los ejemplos 10, 11 y el ejemplo de referencia 12 y los ejemplos comparativos 5 a 11. En los ejemplos 10, 11 y el ejemplo de referencia 12, se obtuvieron ácidos polilácticos que tenían excelentes propiedades físicas de peso molecular promedio en peso, tasa de pérdida de peso térmico y grado de coloración. Sin embargo, en el ejemplo comparativo 5, el peso molecular promedio en peso fue bajo y, por lo tanto, la resistencia mecánica fue baja, y la tasa de pérdida de peso térmica fue elevada y, por lo tanto, la estabilidad térmica fue baja; en los ejemplos comparativos 6 a 9, la tasa de pérdida de peso térmica fue elevada y el grado de coloración fue elevado; y en los ejemplos comparativos 10 y 11, la tasa de pérdida de peso térmica fue elevada. A partir de estos resultados, se desveló que, en los casos en los que las cantidades de impurezas en una solución de ácido láctico al 90 % no superen los valores predeterminados, se puede obtener ácido poliláctico que tiene excelente estabilidad térmica, resistencia mecánica y tonalidad.

30 (Ejemplo 13) Análisis de impurezas en el ácido láctico y evaluación de propiedades físicas de la lactida

35 En un recipiente de reacción que tenía un agitador, se concentraron 150 g del ácido láctico obtenido en el ejemplo 9 con calor a 135 °C a presión atmosférica, durante 30 minutos. Posteriormente, a presión reducida (4.500 a 6.500 Pa), se aumentó la temperatura del líquido de manera gradual a 135 °C (20 minutos), 150 °C (20 minutos) y 160 °C (20 minutos), para obtener oligómeros. Posteriormente, se añadieron 0,75 g de octilato de estaño (II) (Nacalai Tesque) a los oligómeros, y se realizó una destilación simple a presión reducida (1.000 a 2.000 Pa) a 200 °C durante 2 horas, para destilar lactida. Para evitar la obstrucción de las tuberías, la temperatura del condensador se ajustó a 110 °C. Se obtuvo una fracción de lactida en una cantidad de 93,3 g. El rendimiento de lactida fue del 87,2 %, basado en el ácido L-láctico de partida.

40 (Ejemplo 14) Análisis de impurezas en el ácido láctico, y evaluación de propiedades físicas de la lactida

45 Se sintetizó lactida de la misma manera que en el ejemplo 13, excepto en que se utilizaron 150 g de una solución acuosa de ácido láctico, solución acuosa de ácido láctico que se preparó añadiendo al ácido láctico obtenido en el ejemplo 9 los componentes respectivos, entre las impurezas contenidas en la solución acuosa de ácido láctico al 90 % obtenida en el ejemplo 9, de modo que sus concentraciones se ajustaron a 30 ppm de metanol, 100 ppm de ácido fórmico, 200 ppm de ácido pirúvico, 100 ppm de ácido 2-hidroxi-butírico, 3 ppm de furfural, 2 ppm de 5-hidroximetilfurfural y 100 ppm de lactato de metilo.

50 (Ejemplo de referencia 15²) Análisis de impurezas en el ácido láctico y evaluación de las propiedades físicas de la lactida

55 ² fuera del alcance de las reivindicaciones

60 Se sintetizó lactida de la misma manera que en el ejemplo 13, excepto en que se utilizaron 150 g de una solución acuosa de ácido láctico, solución acuosa de ácido láctico que se preparó añadiendo al ácido láctico obtenido en el ejemplo 9 los componentes respectivos, entre las impurezas contenidas en la solución acuosa de ácido láctico al 90 % obtenida en el ejemplo 9, de modo que sus concentraciones se ajustaron a 65 ppm de metanol, 100 ppm de ácido fórmico, 300 ppm de ácido acético, 300 ppm de ácido pirúvico, 150 ppm de ácido 2-hidroxi-butírico, 5 ppm de furfural, 5 ppm de 5-hidroximetilfurfural y 350 ppm de lactato de metilo.

(Ejemplo comparativo 12) Análisis de impurezas en el ácido láctico y evaluación de propiedades físicas de la lactida

Se sintetizó lactida de la misma manera que en el ejemplo 13, excepto en que se utilizaron 150 g de una solución acuosa de ácido láctico, solución acuosa de ácido láctico que se preparó añadiendo al ácido láctico obtenido en el ejemplo 9 los componentes respectivos, entre las impurezas contenidas en la solución acuosa de ácido láctico al 90 % obtenida en el ejemplo 9, de modo que sus concentraciones se ajustaron a 100 ppm de metanol, 100 ppm de ácido fórmico, 300 ppm de ácido acético, 300 ppm de ácido pirúvico, 150 ppm de ácido 2-hidroxibutírico, 5 ppm de furfural, 5 ppm de 5-hidroximetilfurfural y 350 ppm de lactato de metilo.

(Ejemplo comparativo 13) Análisis de impurezas en el ácido láctico y evaluación de las propiedades físicas de la lactida

Se sintetizó lactida de la misma manera que en el ejemplo 13, excepto en que se utilizaron 150 g de una solución acuosa de ácido láctico, solución acuosa de ácido láctico que se preparó añadiendo al ácido láctico obtenido en el ejemplo 9 los componentes respectivos, entre las impurezas contenidas en la solución acuosa de ácido láctico al 90 % obtenida en el ejemplo 9, de modo que sus concentraciones se ajustaron a 65 ppm de metanol, 100 ppm de ácido fórmico, 300 ppm de ácido acético, 600 ppm de ácido pirúvico, 150 ppm de ácido 2-hidroxibutírico, 5 ppm de furfural, 5 ppm de 5-hidroximetilfurfural y 350 ppm de lactato de metilo.

(Ejemplo comparativo 14) Análisis de impurezas en el ácido láctico y evaluación de propiedades físicas de la lactida

Se sintetizó lactida de la misma manera que en el ejemplo 13, excepto en que se utilizaron 150 g de una solución acuosa de ácido láctico, solución acuosa de ácido láctico que se preparó añadiendo al ácido láctico obtenido en el ejemplo 9 los componentes respectivos, entre las impurezas contenidas en la solución acuosa de ácido láctico al 90 % obtenida en el ejemplo 9, de modo que sus concentraciones se ajustaron a 65 ppm de metanol, 100 ppm de ácido fórmico, 300 ppm de ácido acético, 300 ppm de ácido pirúvico, 150 ppm de ácido 2-hidroxibutírico, 5 ppm de furfural, 25 ppm de 5-hidroximetilfurfural y 350 ppm de lactato de metilo.

(Ejemplo comparativo 15) Análisis de impurezas en el ácido láctico y evaluación de las propiedades físicas de la lactida

Se sintetizó lactida de la misma manera que en el ejemplo 13, excepto en que se utilizaron 150 g de una solución acuosa de ácido láctico, solución acuosa de ácido láctico que se preparó añadiendo al ácido láctico obtenido en el ejemplo 9 los componentes respectivos, entre las impurezas contenidas en la solución acuosa de ácido láctico al 90 % obtenida en el ejemplo 9, de modo que sus concentraciones se ajustaron a 65 ppm de metanol, 100 ppm de ácido fórmico, 300 ppm de ácido acético, 300 ppm de ácido pirúvico, 150 ppm de ácido 2-hidroxibutírico, 25 ppm de furfural, 5 ppm de 5-hidroximetilfurfural y 350 ppm de lactato de metilo.

(Ejemplo comparativo 16) Análisis de impurezas en el ácido láctico y evaluación de las propiedades físicas de la lactida

Se sintetizó lactida de la misma manera que en el ejemplo 13, excepto en que se utilizaron 150 g de una solución acuosa de ácido láctico, solución acuosa de ácido láctico que se preparó añadiendo al ácido láctico obtenido en el ejemplo 9 los componentes respectivos, entre las impurezas contenidas en la solución acuosa de ácido láctico al 90 % obtenida en el ejemplo 9, de modo que sus concentraciones se ajustaron a 65 ppm de metanol, 100 ppm de ácido fórmico, 300 ppm de ácido acético, 300 ppm de ácido pirúvico, 150 ppm de ácido 2-hidroxibutírico, 5 ppm de furfural, 5 ppm de 5-hidroximetilfurfural y 650 ppm de lactato de metilo.

(Ejemplo comparativo 17) Análisis de impurezas en el ácido láctico y evaluación de las propiedades físicas de la lactida

Se sintetizó lactida de la misma manera que en el ejemplo 13, excepto en que se utilizaron 150 g de una solución acuosa de ácido láctico, solución acuosa de ácido láctico que se preparó añadiendo al ácido láctico obtenido en el ejemplo 9 los componentes respectivos, entre las impurezas contenidas en la solución acuosa de ácido láctico al 90 % obtenida en el ejemplo 9, de modo que sus concentraciones se ajustaron a 70 ppm de metanol, 750 ppm de ácido 2-hidroxibutírico y 500 ppm de lactato de metilo.

(Ejemplo comparativo 18) Análisis de impurezas en el ácido láctico y evaluación de las propiedades físicas de la lactida

Se produjo lactida de la misma manera que en el ejemplo 13, excepto en que se utilizaron 150 g de una solución acuosa de ácido láctico, solución acuosa de ácido láctico que se preparó añadiendo al ácido láctico obtenido en el ejemplo 9 los componentes respectivos, entre las impurezas contenidas en la solución acuosa de ácido láctico al 90 % obtenida en el ejemplo 9, de modo que sus concentraciones se ajustaron a 600 ppm de ácido acético y 300 ppm de ácido pirúvico.

- En la tabla 6 se muestran los rendimientos y los grados de coloración APHA de las lactidas obtenidas en los ejemplos 13, 14 y el ejemplo de referencia 15 y los ejemplos comparativos 12 a 18. En los ejemplos 13, 14 y el ejemplo de referencia 15, se obtuvieron excelentes resultados para el rendimiento de lactida y el grado de coloración. Sin embargo, en los ejemplos comparativos 12 a 18, el rendimiento fue inferior al 80 %; y en los ejemplos comparativos 13 a 15, en los que estaban contenidas grandes cantidades de ácido pirúvico, furfural y similares, el grado de coloración fue elevado. A partir de estos resultados, se desveló que, en los casos en los que las cantidades de impurezas en el ácido láctico no son superiores a valores predeterminados, se puede obtener lactida que muestra un rendimiento elevado y un bajo grado de coloración.
- 5 (Ejemplo 16) Producción de ácido poliláctico mediante polimerización utilizando lactida como materia prima y evaluación de las propiedades físicas del ácido poliláctico
- 10 En un recipiente de reacción que tenía un agitador, se alimentaron 50 g de la lactida obtenida en el ejemplo 13 y 0,05 g de alcohol estearílico, y la atmósfera dentro del sistema se sustituyó por nitrógeno, seguido de calentamiento de la mezcla resultante a 190 °C para disolver la lactida. Posteriormente, se añadieron 0,025 g de octilato de estaño (II) como catalizador, y la polimerización se llevó a cabo a 190 °C durante 2 horas. El ácido poliláctico obtenido se analizó para determinar su peso molecular promedio en peso, punto de fusión, tasa de pérdida de peso térmica y grado de coloración mediante los procedimientos descritos en el ejemplo 6.
- 15 (Ejemplo 17) Producción de ácido poliláctico mediante polimerización utilizando lactida como materia prima y evaluación de las propiedades físicas del ácido poliláctico
- 20 Se produjo ácido poliláctico mediante polimerización de lactida, y se analizó mediante el mismo procedimiento que en el ejemplo 16, excepto en que se utilizaron 50 g de la lactida obtenida en el ejemplo 14.
- 25 (Ejemplo de referencia 18³) Producción de ácido poliláctico mediante polimerización utilizando lactida como materia prima y evaluación de las propiedades físicas del ácido poliláctico
- 30 ³ fuera del alcance de las reivindicaciones
- 35 (Ejemplo comparativo 19) Producción de ácido poliláctico mediante polimerización utilizando lactida como materia prima y evaluación de las propiedades físicas del ácido poliláctico
- 40 Se produjo ácido poliláctico mediante polimerización de lactida, y se analizó mediante el mismo procedimiento que en el ejemplo 16, excepto en que se utilizaron 50 g de la lactida obtenida en el ejemplo comparativo 12.
- 45 (Ejemplo comparativo 20) Producción de ácido poliláctico mediante polimerización utilizando lactida como materia prima y evaluación de las propiedades físicas del ácido poliláctico
- 50 Se produjo ácido poliláctico mediante polimerización de lactida, y se analizó mediante el mismo procedimiento que en el ejemplo 16, excepto en que se utilizaron 50 g de la lactida obtenida en el ejemplo comparativo 13.
- 55 (Ejemplo comparativo 21) Producción de ácido poliláctico mediante polimerización utilizando lactida como materia prima y evaluación de las propiedades físicas del ácido poliláctico
- 60 Se produjo ácido poliláctico mediante polimerización de lactida, y se analizó mediante el mismo procedimiento que en el ejemplo 16, excepto en que se utilizaron 50 g de la lactida obtenida en el ejemplo comparativo 14.
- (Ejemplo comparativo 22) Producción de ácido poliláctico mediante polimerización utilizando lactida como materia prima y evaluación de las propiedades físicas del ácido poliláctico
- Se produjo ácido poliláctico mediante polimerización de lactida, y se analizó mediante el mismo procedimiento que en el ejemplo 16, excepto en que se utilizaron 50 g de la lactida obtenida en el ejemplo comparativo 15.
- (Ejemplo comparativo 23) Producción de ácido poliláctico mediante polimerización utilizando lactida como materia prima, y evaluación de las propiedades físicas del ácido poliláctico
- Se produjo ácido poliláctico mediante polimerización de lactida, y se analizó mediante el mismo procedimiento que en el ejemplo 16, excepto en que se utilizaron 50 g de la lactida obtenida en el ejemplo comparativo 16.

(Ejemplo comparativo 24) Producción de ácido poliláctico mediante polimerización utilizando lactida como materia prima, y evaluación de las propiedades físicas del ácido poliláctico

5 Se produjo ácido poliláctico mediante polimerización de lactida, y se analizó mediante el mismo procedimiento que en el ejemplo 16, excepto en que se utilizaron 50 g de la lactida obtenida en el ejemplo comparativo 17.

(Ejemplo comparativo 25) Producción de ácido poliláctico mediante polimerización utilizando lactida como materia prima, y evaluación de las propiedades físicas del ácido poliláctico

10 Se produjo ácido poliláctico mediante polimerización de lactida, y se analizó mediante el mismo procedimiento que en el ejemplo 16, excepto en que se utilizaron 50 g de la lactida obtenida en el ejemplo comparativo 18.

15 En la tabla 6 se muestran los pesos moleculares promedio en peso, los puntos de fusión, las tasas de pérdida de peso térmica y los grados de coloración APHA de los ácidos polilácticos obtenidos en los ejemplos 16, 17 y el ejemplo de referencia 18 y los ejemplos comparativos 19 a 25. En los ejemplos 16, 17 y el ejemplo de referencia 18, se obtuvieron ácidos polilácticos que tenían excelentes propiedades físicas de peso molecular promedio en peso, tasa de pérdida de peso térmica y grado de coloración. Sin embargo, en los ejemplos comparativos 19 y 20, el peso molecular promedio en peso fue pequeño. Además, en los ejemplos comparativos 20 a 22, la tasa de pérdida de peso fue elevada y el grado de coloración fue elevado; y en los ejemplos comparativos 23 a 25, la tasa de pérdida de peso fue elevada.

20

[Tabla 6]

Acido Láctico	Ejemplo 10	Ejemplo 11	Ejemplo de referencia 12	Ejemplo comparativo 5	Ejemplo comparativo 6	Ejemplo comparativo 7	Ejemplo comparativo 8	Ejemplo comparativo 9	Ejemplo comparativo 10	Ejemplo comparativo 11
Contenido de Impurezas (ppm)	0	30	65	100	65	65	65	65	70	0
	200	200	300	300	300	300	300	300	300	600
	200	200	300	300	600	300	300	300	200	200
	0	100	150	150	150	150	150	150	750	0
	0	3	5	5	5	5	5	5	0	0
	0	2	5	5	5	25	5	5	0	0
	0	100	350	350	350	350	350	650	500	0
Resultados de la evaluación de polimerización directa	175.000	156.000	145.000	115.000	128.000	153.000	144.000	118.000	149.000	161.000
	167	165	164	163	164	165	163	162	162	165
	4,9	5,5	5,9	6,7	8,5	8,6	7,9	6,5	6,5	6,7
	7	10	15	16	25	40	20	25	7	8
Lactida	Ejemplo 13	Ejemplo 14	Ejemplo de referencia 15	Ejemplo comparativo 12	Ejemplo comparativo 13	Ejemplo comparativo 14	Ejemplo comparativo 15	Ejemplo comparativo 16	Ejemplo comparativo 17	Ejemplo comparativo 18
Evaluación de la lactida	85	81	80	78	73	75	76	75	77	75
	2	2	6	8	12	10	10	10	6	6

(continuación)

Polimerización de ácido poliláctico a partir de lactida	Ejemplo 16	Ejemplo 17	Ejemplo de referencia 18	Ejemplo comparativo 19	Ejemplo comparativo 20	Ejemplo comparativo 21	Ejemplo comparativo 22	Ejemplo comparativo 23	Ejemplo comparativo 24	Ejemplo comparativo 25
Peso molecular promedio en peso (Mw)	135.000	133.000	122.000	118.000	109.000	124.000	123.000	130.000	129.000	131.000
Punto de fusión (°C)	165	164	162	162	162	163	162	163	162	163
Tasa de pérdida de peso (%)	5,1	5,3	6,2	6,0	6,3	7,4	7,0	7,2	7,5	7,3
Grado de coloración (APHA)	5	6	8	8	11	14	12	9	8	9

APLICABILIDAD INDUSTRIAL

5 La solución acuosa de ácido láctico al 90 %, de la presente invención, se puede utilizar de manera adecuada para la fabricación de alimentos y productos farmacéuticos a base de ácido láctico, y como material monomérico para ácido poliláctico, que es un plástico biodegradable de utilización general. Además, el ácido poliláctico obtenido utilizando la solución acuosa de ácido láctico al 90 %, de la presente invención, como materia prima tiene una excelente estabilidad térmica, resistencia mecánica y tonalidad, de modo que el ácido poliláctico es adecuado para diversas utilidades, tales como fibras, películas y artículos moldeados.

10 DESCRIPCIÓN DE LOS SÍMBOLOS

- 1. Reactor de fermentación
- 2. Recipiente de separación por membrana
- 3. Elemento de membrana de separación
- 15 4. Aparato de suministro de gas
- 5. Agitador
- 6. Aparato de control de diferencia de carga hidráulica
- 7. Bomba de suministro de medio de cultivo
- 8. Bomba de suministro de solución de ajuste de pH
- 20 9. Sensor aparato de control de pH
- 10. Bomba de circulación de líquido de fermentación
- 11. Sensor de nivel
- 12. Controlador de temperatura
- 13. Tanque de líquido crudo
- 25 14. Celda equipada con membrana de nanofiltración o membrana de ósmosis inversa
- 15. Bomba de presión elevada
- 16. Flujo de permeado de membrana
- 17. Flujo de concentrado de membrana
- 18. Flujo de medio de cultivo enviado por la bomba de presión elevada
- 30 19. Membrana de nanofiltración
- 20. Placa de soporte

LISTA DE SECUENCIAS

- 35 <110> Toray Industries, Inc.
- <120> Procedimiento de fabricación de ácido láctico y ácido poliláctico
- <130> 09088EP02
- 40 <160> 11
- <170> PatentIn version 3.1
- 45 <210> 1
- <211> 999
- <212> ADN
- <213> Xenopus laevis
- 50 <400> 1

ES 2 765 889 T3

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

<210> 2
<211> 85
5 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
10 <223> cebador

<400> 2
tattgattta tagtcgtaac tacaagaca agcaaaataa aatacgttcg ctctattaag 60

atggcaactg tgaaggataa actca 85

15 <210> 3
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

20 <220>
<223> cebador

<400> 3

25 aggcgtatca cgaggccctt 20

<210> 4
<211> 60
<212> ADN

ES 2 765 889 T3

<213> Artificial
 <220>
 <223> cebador
 5 <400> 4
 gaattaattc ttgaagacga aagggcctcg tgatagcct agattgtact gagagtgcac 60
 <210> 5
 10 <211> 80
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 15 <223> cebador
 <400> 5
 aaaaaataac ataataactga aagaaagcat taagaaggcg gatgtgtcaa acaccaccgt 60
 ctgtgcggtg tttcacaccg 80
 20 <210> 6
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 25 <220>
 <223> cebador
 <400> 6
 30 tagattggcc gtaggggctg 20
 <210> 7
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> cebador
 <400> 7
 40 cacgcaacgc gtaagaaaca 20
 <210> 8
 <211> 24
 <212> ADN
 45 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador
 50 <400> 8
 gacaattctg gttaggtcca agag 24
 <210> 9
 <211> 24
 55 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador
 60 <400> 9
 ttaagctgct gcggagcttc cacg 24

ES 2 765 889 T3

<210> 10
<211> 22
<212> ADN
<213> Artificial
5
<220>
<223> cebador

<400> 10
10 atgtctgcc ctaagaagat cg 22

<210> 11
<211> 24
<212> ADN
15 <213> Artificial

<220>
<223> cebador

<400> 11
20 ttaagcaagg atttcttaa ctc 24

REIVINDICACIONES

- 5 1. Solución acuosa de ácido láctico al 90 % que contiene metanol a una concentración no superior a 50 ppm, ácido pirúvico a una concentración no superior a 500 ppm, furfural a una concentración no superior a 15 ppm, 5-hidroximetilfurfural a una concentración no superior a 15 ppm, lactato de metilo a una concentración no superior a 600 ppm, ácido acético a una concentración no superior a 500 ppm y ácido 2-hidroxi-butírico a una concentración no superior a 500 ppm, en la que la pureza óptica de dicho ácido láctico no es inferior al 99,9 %.
- 10 2. Solución acuosa de ácido láctico al 90 %, según la reivindicación 1, que contiene ácido pirúvico a una concentración no superior a 300 ppm.
3. Solución acuosa de ácido láctico al 90 %, según la reivindicación 1 o 2, que contiene metanol a una concentración no superior a 30 ppm.
- 15 4. Solución acuosa de ácido láctico al 90 %, según cualquier de las reivindicaciones 1 a 3, que contiene furfural a una concentración no superior a 5 ppm.
5. Solución acuosa de ácido láctico al 90 %, según cualquier de las reivindicaciones 1 a 4, que contiene ácido acético a una concentración no superior a 300 ppm.
- 20 6. Solución acuosa de ácido láctico al 90 %, según cualquier de las reivindicaciones 1 a 5, que contiene ácido 2-hidroxi-butírico a una concentración no superior a 200 ppm.

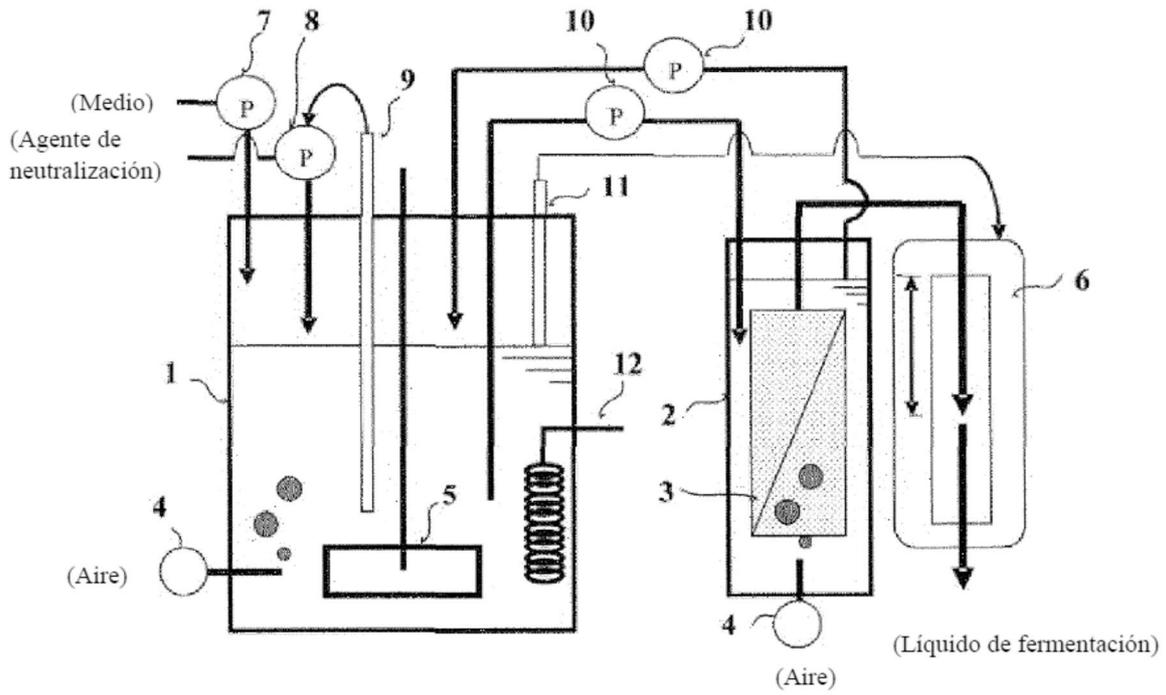


Fig.1

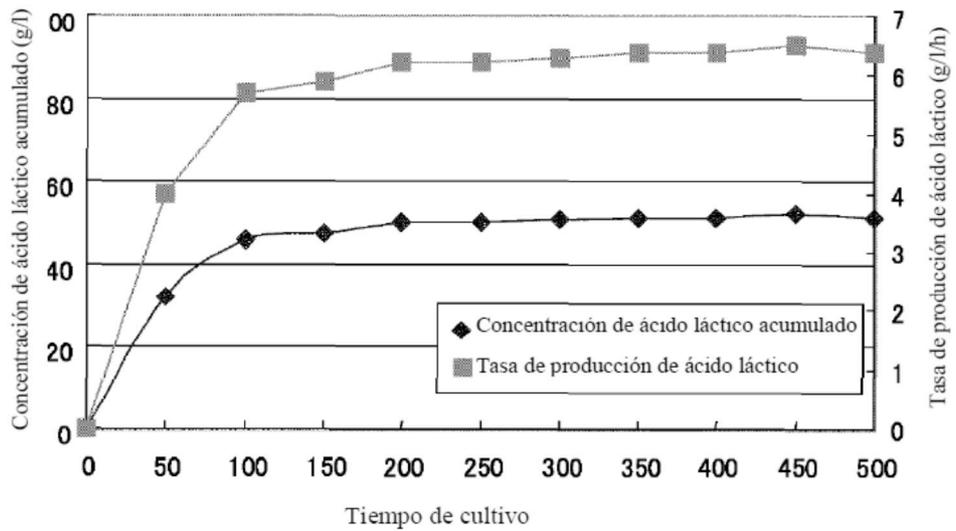


Fig.2

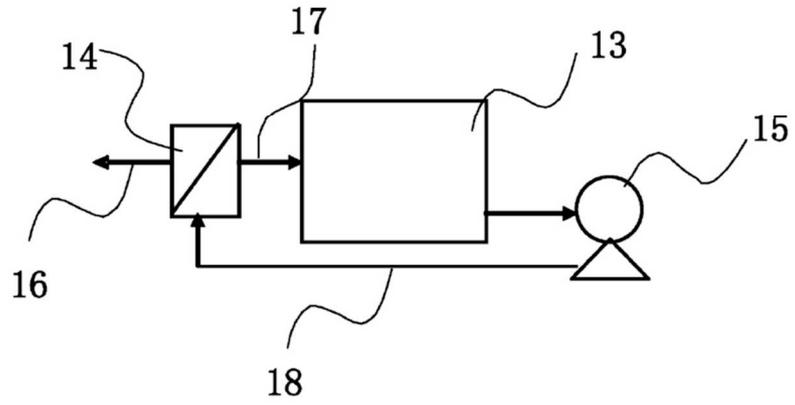


Fig.3

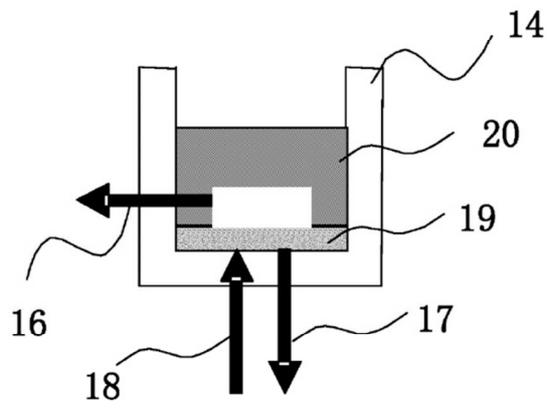


Fig.4

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citada por el solicitante es únicamente para mayor comodidad del lector. No forman parte del documento de la Patente Europea. Incluso teniendo en cuenta que la compilación de las referencias se ha efectuado con gran cuidado, los errores u omisiones no pueden descartarse; la EPO se exime de toda responsabilidad al respecto.

Documentos de patentes citados en la descripción

- WO 2007097260 A
- JP 2001506274 W
- JP 2005270025 A
- US 5503750 A
- US 5681728 A
- US 20040033573 A
- JP 6279577 A
- JP 7133344 A
- JP 8188642 A
- JP 9031170 A
- US 2008254165 A1
- WO 2004057008 A1
- CN 101306993 A
- JP 2008029329 A
- JP 62201606 A
- JP 2008048726 A

Literatura no patente citada en la descripción

- **J. VIJAYAKUMAR et al.** *CHEMICAL AND BIO-CHEMICAL ENGINEERING QUARTERLY*, 2008, vol. 22 (2), 245-264
- **S. ZHOU et al.** *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 2003, vol. 69 (1), 399-40
- **OKINO et al.** *APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY*, 2008, vol. 78 (3), 449-454