

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 795 837**

51 Int. Cl.:

C12P 1/00	(2006.01)
C12P 7/56	(2006.01)
C12P 7/40	(2006.01)
B01D 65/06	(2006.01)
B01D 65/02	(2006.01)
B01D 61/18	(2006.01)
B01D 63/02	(2006.01)
B01D 71/34	(2006.01)
C12M 1/26	(2006.01)
C12M 1/00	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.09.2011 PCT/JP2011/070109**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **22.03.2012 WO12036003**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.09.2011 E 11825009 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.05.2020 EP 2617832**

54 Título: **Método de producción de productos químicos mediante fermentación continua**

30 Prioridad:

14.09.2010 JP 2010205239

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

24.11.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**KOBAYASHI, ATSUSHI;
CHEON, JIHOON;
TAKEUCHI, NORIHIRO;
NISHIDA, MAKOTO;
TANAKA, YUJI y
MINEGISHI, SHIN-ICHI**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 795 837 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

Método de producción de productos químicos mediante fermentación continua

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un método para producir productos químicos mediante fermentación continua usando una membrana de separación.

Antecedentes de la técnica

10 Las membranas de separación se han utilizado en una amplia gama de campos, incluyendo el campo del tratamiento del agua, tal como la producción de agua potable, la purificación de agua y el tratamiento de aguas residuales, el campo de la producción de fármacos y en la industria alimentaria, y también tienen aplicación en el campo de la fermentación. En el campo del tratamiento del agua tal como la producción de agua potable, la purificación de agua y el tratamiento de aguas residuales, se usan membranas de separación para eliminar impurezas del agua como un medio alternativo a la filtración con arena y la sedimentación y coagulación convencionales. El tratamiento de aguas residuales y la industria alimentaria emplean ampliamente la técnica de membrana de separación en la que grandes cantidades de aguas residuales o materia prima de alta concentración prima se cargan en un recipiente de procesado y se tratan mientras se mantienen los microbios a alta concentración, porque la técnica ofrece una alta proporción de eliminación y produce un líquido de alta pureza.

15 En tales campos, incluido el campo del tratamiento del agua y la industria alimentaria que utilizan membranas de separación, existe la necesidad de mejorar el rendimiento de permeación para reducir los costes. Con este fin, por ejemplo, ha habido intentos de reducir el área de la membrana con el uso de una membrana de separación que sobresale en el rendimiento de permeación y reducir el tamaño del dispositivo, reduciendo así el coste de la instalación, el coste de sustitución de la membrana y el área de instalación. Por consideraciones de coste, ha despertado interés una membrana de fibra hueca que tiene un área de filtro amplia por área de instalación.

20 En los últimos años, se han propuesto activamente métodos de producción continua que implican el cultivo de microbios y células cultivadas. En esta técnica, los microbios o las células cultivadas se filtran a través de una membrana de separación, y los microbios o células cultivadas separados se retienen o refluyen en el medio de cultivo simultáneamente cuando se recoge el producto del filtrado. De esta manera, la técnica puede mantener altas concentraciones de microbios o células en el medio de cultivo. Por ejemplo, el Documento de Patente 1 propone aumentar la productividad mejorando las concentraciones de microbios o células en un medio de cultivo y manteniendo altas concentraciones en una fermentación continua llevada a cabo con una membrana de separación.

25 A pesar de los estudios activos de la técnica de membrana de separación para el cultivo de microbios y la separación de microbios, el tratamiento de un líquido biológico a tratar, tal como un medio de cultivo por medio de separación de membrana, implica un ensuciamiento grave de la membrana por los microbios, el azúcar, las proteínas, los lípidos o similares contenidos en el líquido a tratar. Esto es problemático porque deteriora rápidamente el flujo de permeación de la membrana.

30 Otro problema de la técnica de membrana de separación para el cultivo de microbios y la separación de microbios es el control de la proliferación de microbios. La separación de la membrana utilizando el filtro de membrana puede mantener altas concentraciones de microbios o células y, así, puede producir productos a altas velocidades de producción con grandes cantidades de microbios. Sin embargo, aumentar el tiempo de fermentación para aprovechar la fermentación continua permite que los microbios proliferen continuamente, y aumenta excesivamente la concentración de microbios, aumentando así la presión transmembrana. Una posible solución es extraer algunos de los microbios durante la operación y controlar la concentración de microbios. Sin embargo, esto puede causar un problema en el tratamiento de los microbios retirados, o puede aumentar la posibilidad de contaminación con los otros microbios en el fermentador durante o después de la extracción de los microbios.

35 En los procesos comunes de separación de membrana, la superficie de la membrana se lava de forma regular o irregular para eliminar los materiales adheridos o adsorbidos a la superficie de la membrana (por ejemplo, SS (sólido suspendido) adherido a la superficie de la membrana) y mantener el rendimiento del filtro. Por ejemplo, el Documento de Patente 2 propone lavar una membrana mediante la permeación inversa programada del permeado desde el lado del permeado para mantener el rendimiento del filtro. El Documento de Patente 3 propone realizar la filtración mientras se lava una superficie de membrana con aire suministrado desde abajo de una unidad de filtración. El Documento de Patente 4 propone un método para la limpieza química de una unidad de filtración para permitir el lavado de una superficie de membrana que no puede lavarse mediante los métodos descritos en los Documentos de Patente 2 y 3. Sin embargo, estos métodos de tratamiento son para el lavado de una superficie de membrana, y no pueden controlar las concentraciones de microbios. La limpieza química es particularmente problemática, ya que tiene efectos adversos sobre el producto de fermentación, deteriora la membrana y acorta la vida útil de la membrana, y requiere un tratamiento del líquido residual producido por la limpieza química.

45 Entre las otras técnicas consideradas posibles se incluyen: una técnica que aumenta el efecto de lavado usando agua a alta temperatura como agua de lavado a contracorriente cuando se lleva a cabo el lavado a contracorriente usando

5 permeado (Documento de Patente 5); una técnica de operación de lavado de membrana de separación que implica una etapa de concentración, una etapa de separación por membrana y una etapa de lavado con agua tibia (Documento de Patente 6); y un método de lavado de membrana de separación que utiliza agua caliente y una hidrolasa (Documento de Patente 7). Sin embargo, con estos métodos es difícil controlar la proliferación de microbios, y la hidrolasa es costosa y añade costes directamente.

Documentos de los antecedentes de la técnica

Documento de patente

Documento de patente 1: WO2007/097260

Documento de patente 2: JP-A-8-141375

10 Documento de patente 3: JP-A-2001-38177

Documento de patente 4: JP-A-2002-126470

Documento de patente 5: JP-A-2008-289959

Documento de patente 6: Patente Japonesa N.º 3577992

Documento de patente 7: JP-A-2006-314883

15 **Compendio de la invención**

Problemas que debe resolver la invención

20 Como se ha descrito antes, las técnicas convencionales no solucionan problemas tales como la complicada etapa de lavado, el tratamiento del líquido residual generado por el lavado y la retención del rendimiento del filtro y el control de las concentraciones excesivas de microbios para el cultivo de microbios a alta concentración. Por consiguiente, existe la necesidad de desarrollar un método de operación de filtro de membrana para mantener el rendimiento del filtro, y un método para controlar las concentraciones de microbios.

25 Es un objeto de la presente invención proporcionar un método de lavado a contracorriente capaz de mantener el rendimiento del filtro para el cultivo a alta concentración de una mezcla de microbios, y al mismo tiempo controlar las concentraciones de microbios en la producción y recogida de un producto mediante fermentación usando una membrana de separación.

Medios para resolver los problemas

La presente invención puede resolver los problemas anteriores con las siguientes configuraciones (1) a (5).

(1) Un método para producir productos químicos mediante una fermentación continua, comprendiendo el método:

30 (a) generar productos químicos por fermentación con un medio de cultivo que contiene una materia prima de fermentación y microbios o células cultivadas a una temperatura de 15°C a 65°C en un fermentador;

(b) filtrar el medio de cultivo a través de una membrana de separación;

(c) recoger el producto químico del filtrado;

(d) retener o refluir los restos sin filtrar en el fermentador;

(e) añadir materia prima de fermentación al medio de cultivo en el fermentador; y

35 (f) lavar la membrana de separación con un líquido de lavado suministrado desde el lado de permeado de la membrana de separación durante la etapa (a) en un estado en el que la fermentación con los microbios o las células cultivadas continúa en el medio de cultivo en el fermentador;

40 donde el líquido de lavado es agua que tiene una temperatura al menos 5°C mayor que la temperatura del medio de cultivo en el fermentador en la etapa (a) hasta una temperatura máxima del agua de lavado de 100°C, y la concentración de los microbios en el fermentador se controla suministrando el líquido de lavado.

(2) El método para producir productos químicos mediante fermentación continua según (1), en el que el líquido de lavado contiene un agente oxidante.

45 (3) El método para producir productos químicos mediante fermentación continua según (2), en el que el agente oxidante contiene al menos un agente seleccionado del grupo que consiste en hipoclorito, dióxido de cloro, ozono y peróxido de hidrógeno.

(4) El método para producir productos químicos mediante fermentación continua según (1), en el que el líquido de lavado contiene un ajustador de pH.

(5) El método para producir productos químicos mediante fermentación continua según (1), en el que el líquido de lavado contiene la materia prima de fermentación.

5 **Ventaja de la invención**

La presente invención tiene ventajas en la operación de la fermentación continua llevada a cabo para filtrar un medio de cultivo de fermentación con una membrana de separación y eliminar el permeado que contiene el producto químico mientras que retiene continuamente los restos no filtrados en un fermentador. Específicamente, la invención posibilita de forma eficaz el lavado de productos que ensucian la membrana que se originan de la filtración con membrana y el control de las concentraciones de microbios en un fermentador. La invención también puede mejorar en gran medida la eficiencia de la producción de fermentación de forma estable y económica, y puede evitar la generación de un líquido de lavado de residuos y un medio de cultivo retirado, haciendo posible reducir los costes gracias a la reducción del coste del tratamiento. Por lo tanto, la invención puede producir de manera estable productos de fermentación a bajo coste en una amplia diversidad de industrias de fermentación.

15 **Breve descripción de los dibujos**

[Fig. 1] La Fig. 1 es una vista lateral esquemática que explica un ejemplo de un dispositivo de fermentación continua con separación por membrana utilizado en la presente invención.

[Fig. 2] La Fig. 2 es un diagrama que representa el método y el procedimiento de lavado a contracorriente realizado con un módulo de membrana en la presente invención.

20 [Fig. 3] La Fig. 3 es un diagrama que representa los cambios en la concentración de microbios a lo largo del tiempo en experimentos de filtración con fermentación continua según los Ejemplos 1 a 3 y los Ejemplos Comparativos 1 y 2.

[Fig. 4] La Fig. 4 es un diagrama que representa los cambios en la presión transmembrana a lo largo del tiempo en experimentos de filtración con fermentación continua según los Ejemplos 1 a 3 y los Ejemplos Comparativos 1 y 2.

25 [Fig. 5] La Fig. 5 es un diagrama que representa cambios en la concentración de microbios a lo largo del tiempo en experimentos de filtración con fermentación continua según los Ejemplos 4 y 5 y el Ejemplo Comparativo 3.

[Fig. 6] La Fig. 6 es un diagrama que representa cambios en la presión transmembrana a lo largo del tiempo en experimentos de filtración con fermentación continua según los Ejemplos 4 y 5 y el Ejemplo Comparativo 3.

Modo para llevar a cabo la invención

30 La presente invención es un método para operar un dispositivo de fermentación continua en una fermentación continua que utiliza un módulo de membrana para filtración y en el que el permeado que contiene el producto químico se extrae mientras se retienen continuamente los restos no filtrados en un fermentador. El método incluye lavar la membrana con agua a alta temperatura suministrada desde el lado de permeado del módulo de membrana y controlar las condiciones de suministro de agua a alta temperatura según la concentración de microbios en el fermentador.

35 La membrana de separación utilizada para el módulo de membrana de la presente invención puede ser una membrana orgánica o una membrana inorgánica, siempre que tenga resistencia química. Ejemplos de las mismas incluyen poli(fluoruro de vinilideno), polisulfona, polietersulfona, politetrafluoroetileno, polietileno, polipropileno y membranas cerámicas.

40 La membrana de separación usada en la presente invención es preferiblemente una membrana porosa que tiene un tamaño de poro promedio de 0,01 μm o mayor o menor de 1 μm . La membrana de separación puede tener cualquier forma y puede ser, por ejemplo, una membrana plana o una membrana de fibra hueca.

45 El tamaño de poro promedio de la superficie de la membrana de separación se determina a partir del promedio numérico obtenido por la medición de 20 diámetros de poro seleccionados al azar en una fotografía de una superficie de la membrana tomada con un aumento de 60.000x con un microscopio electrónico de barrido. Cuando los poros no son circulares, el tamaño de poro promedio de la superficie se determina utilizando un método en el que el diámetro de un círculo (círculo equivalente) que tiene la misma área que el poro, determinada con un dispositivo como un dispositivo de procesamiento de imágenes se utiliza como diámetro del poro.

En una realización preferida de la presente invención, la membrana de separación se puede usar para llevar a cabo la filtración sobre una presión transmembrana de 0,1 a 20 kPa.

50 El módulo de membrana de la presente invención no está particularmente limitado, siempre que esté realizado en materiales que tengan una excelente resistencia al calor, y esté conformado para permitir que se inyecte agua a alta temperatura hacia el lado de la alimentación desde el lado de permeado del módulo.

La materia prima para la fermentación de microbios y células cultivadas usada en la presente invención no está particularmente limitada, siempre que pueda promover el crecimiento de los microbios para ser cultivados por fermentación o células cultivadas para ser cultivadas por fermentación, y pueda producir deseablemente productos químicos como los productos previstos de la fermentación. Ejemplos preferidos de la materia prima de fermentación incluyen medios líquidos comunes que contienen apropiadamente una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, sales inorgánicas y, según sea necesario, cantidades minoritarias de nutrientes orgánicos tales como aminoácidos y vitaminas. También es posible utilizar, por ejemplo, aguas residuales o aguas cloacales, ya sea directamente o con la materia prima de fermentación, siempre que sea un líquido que contenga en parte materiales que puedan promover el crecimiento de los microbios para ser cultivados por fermentación células cultivadas para ser cultivadas por fermentación, y deseablemente pueda producir productos químicos como los productos previstos de la fermentación.

Ejemplos de la fuente de carbono incluyen azúcares tales como glucosa, sacarosa, fructosa, galactosa y lactosa; almidones e hidrolizados de almidón que contienen dichos azúcares; melazas de batata; melazas de remolacha azucarera; jugo de caña; extractos o concentrados de melaza de remolacha azucarera o zumo de caña; filtrados de melazas de remolacha azucarera o jugo de caña; azúcares en bruto purificados o cristalizados a partir de un melaza (melaza de alto rendimiento), una melaza de remolacha azucarera o un jugo de caña; azúcares blancos purificados o cristalizados a partir de una remolacha azucarera o un jugo de caña; ácidos orgánicos tales como ácido acético y ácido fumárico; alcoholes tales como etanol; y glicerina. Tal como se usa en el presente documento, azúcares se refieren a los primeros productos de oxidación de polialcohol y carbohidratos que tienen un grupo aldehído o un grupo cetona, clasificados como aldosa en el caso del grupo aldehído, o cetosa en el caso del grupo cetona.

Ejemplos de la fuente de nitrógeno incluyen sales de amonio, urea, nitratos y otras fuentes de nitrógeno orgánico utilizadas como suplementos. Otros ejemplos incluyen harinas oleaginosas, hidrolizados de soja, caseínas descompuestas, otros aminoácidos, vitaminas, licor destilado de maíz, levaduras o extractos de levadura, extractos de carne, péptidos tales como peptona y diversos microbios de fermentación e hidrolizados de los mismos.

Pueden usarse apropiadamente como sales inorgánicas materiales, por ejemplo, tales como fosfatos, sales de magnesio, sales de calcio, sales de hierro y sales de manganeso.

En la presente invención, el cultivo por fermentación de microbios se lleva hasta un pH y temperatura apropiados según la especie de microbio y la productividad del producto. Típicamente, el cultivo por fermentación de microbios se ajusta a un pH de 4 a 8 y una temperatura de 15 a 65°C. El pH del medio de cultivo de fermentación se ajusta a un valor predeterminado del intervalo anterior con materiales como ácido inorgánico o ácido orgánico, una sustancia alcalina, urea, hidróxido de calcio, carbonato de calcio y amoníaco.

La velocidad de suministro de oxígeno para el cultivo necesita aumentarse, esto se puede lograr mediante el uso de varios métodos, que incluyen, por ejemplo, aumentar la cantidad de la aireación, aumentar la concentración de oxígeno mediante la adición de oxígeno al aire, aplicar presión al medio de cultivo de fermentación, y aumentar la velocidad de agitación. Por otro lado, si la velocidad de suministro de oxígeno necesita reducirse, esto puede se puede lograr disminuyendo la cantidad de la aireación o suministrando gases como el dióxido de carbono y gases libres de oxígeno como el nitrógeno y el argón con aire.

En la presente invención, el medio de cultivo de fermentación que contiene microbios o células cultivadas se extrae preferiblemente en una cantidad ajustada adecuadamente según la OD600 o MLSS (sólido suspendido de licor mixto) del medio de cultivo de fermentación, de modo que la concentración de los microbios o células cultivadas no disminuya y reduzca la productividad del producto de fermentación.

Típicamente, el procedimiento de cultivo continuo que implica la proliferación de microbios frescos capaces de producir productos de fermentación se lleva a cabo preferiblemente en un único fermentador con el objeto de controlar el cultivo. Sin embargo, el número de fermentadores no está limitado, siempre que se utilice el método de cultivo de fermentación continua que genera productos mediante la proliferación de microbios. Se puede usar más de un fermentador por razones tales como un pequeño volumen de fermentador. En este caso, se puede obtener una alta productividad de fermentación llevando a cabo un cultivo continuo con una pluralidad de fermentadores conectados entre sí en paralelo o en serie.

Como los microbios y células cultivadas usadas en la presente invención se usan células eucariotas o células procariotas. Específicamente, se usan los que se usan comúnmente en la industria de la fermentación, incluidos, por ejemplo, hongos tales como levaduras y hongos filamentosos, microbios como *Escherichia coli*, bacterias del ácido láctico, bacterias corineformes y actinomicetos, y células animales y células de insectos. Las bacterias y las células pueden ser las aisladas del medio ambiente natural o aquellas con propiedades parcialmente modificadas mediante mutación o recombinación genética.

Los productos químicos obtenidos por el método de producción de la presente invención son sustancias producidas por los microbios o células cultivadas en el medio de cultivo de fermentación. Ejemplos de los productos químicos incluyen sustancias producidas a gran escala en la industria de la fermentación, incluidos, por ejemplo, alcoholes, ácidos orgánicos, aminoácidos y ácidos nucleicos. La presente invención también es aplicable a la producción de sustancias tales como enzimas, antibióticos y proteínas recombinantes. Ejemplos de los alcoholes incluyen etanol,

1,3-butanodiol, 1,4-butanodiol y glicerol. Ejemplos de los ácidos orgánicos incluyen ácido acético, ácido láctico, ácido pirúvico, ácido succínico, ácido málico, ácido itacónico y ácido cítrico. Ejemplos de los ácidos nucleicos incluyen inosina, guanosina y citidina.

5 Los productos químicos obtenidos por el método de producción de la presente invención son preferiblemente productos líquidos que contienen al menos uno seleccionado de productos químicos, productos lácteos, productos farmacéuticos y productos alimenticios o de la fermentación de bebidas. Ejemplos de los productos químicos incluyen sustancias, tales como ácidos orgánicos, aminoácidos y ácidos nucleicos, que son aplicables a la producción química mediante etapas que siguen a la filtración por separación de membrana. Ejemplos de los productos lácteos incluyen sustancias, como la leche baja en grasa, aplicable a la producción de lácteos mediante etapas que siguen a la filtración por separación de membrana. Ejemplos de los productos farmacéuticos incluyen sustancias, tales como enzimas, antibióticos y proteínas recombinantes, aplicables a la producción de fármacos mediante etapas que siguen a la filtración por separación de membrana. Ejemplos de los alimentos incluyen sustancias, como las bebidas de ácido láctico, aplicables a la producción de alimentos mediante etapas que siguen a la filtración por separación de membrana. Ejemplos de los productos de la fermentación de bebidas incluyen sustancias, como la cerveza y el shochu (alcohol destilado), aplicables a la producción de bebidas que contienen alcohol mediante etapas que siguen a la filtración por separación de membrana.

20 En la presente invención, la presión transmembrana para la filtración del medio de cultivo de fermentación de microbios y células cultivadas con la membrana de separación del módulo de membrana no está limitada, siempre que la filtración se produzca en condiciones que no permitan fácilmente que los microbios, las células cultivadas y los componentes del medio obstruyan la membrana. Sin embargo, es importante que la filtración se lleve a cabo a una presión transmembrana de 0,1 kPa a 20 kPa. La presión transmembrana es preferiblemente de 0,1 kPa a 10 kPa, más preferiblemente de 0,1 kPa a 5 kPa. Una presión transmembrana fuera de estos intervalos puede causar problemas en la operación de fermentación continua ya que los microbios y los componentes del medio obstruyen fácilmente la membrana y reducen las cantidades de permeado.

25 La fuerza impulsora de la filtración puede ser proporcionada por una diferencia de nivel de líquido (diferencia de carga de agua), o por la presión transmembrana generada a través de la membrana de separación con una bomba de circulación de flujo cruzado. Alternativamente, se puede instalar una bomba de succión en el lado de permeado de la membrana de separación para proporcionar una fuerza impulsora de filtración. Cuando se usa una bomba de circulación de flujo cruzado, la presión transmembrana se puede controlar con presión de succión. La presión transmembrana también puede ser controlada mediante la presión del gas o del líquido que introduce presión para el lado del medio de cultivo de fermentación. Para el control de presión, se puede usar como la presión transmembrana para el control de la presión transmembrana la diferencia de presión entre la presión en el lado del medio de cultivo de fermentación y la presión en el lado de permeado de la membrana de separación.

35 La presente invención usa agua a alta temperatura que tiene un efecto de lavado de la membrana y que puede reducir la concentración de microbios. El agua a alta temperatura se ajusta a una temperatura 5°C o mayor que la temperatura del medio de cultivo y menor de 100°C, más preferiblemente una temperatura al menos 10°C mayor que la temperatura de cultivo y menor de 100°C. Temperaturas inferiores a la temperatura media de cultivo dificultan el control de las concentraciones de microbios en la fermentación continua. Por otro lado, si la temperatura supera los 150°C, se debe aplicar una presión muy alta para mantener el agua a alta temperatura en estado líquido. Por lo tanto, las temperaturas en estos intervalos no son prácticas. Si el agua de lavado a contracorriente tiene una temperatura mayor que en las condiciones anteriores, aumenta la posibilidad de matar rápidamente grandes cantidades de microbios de una manera que depende de las características de los microbios. Por lo tanto, es deseable medir con antelación la tasa de destrucción dependiente de la temperatura de los microbios.

45 Tal como se usa en el presente documento, el lavado a contracorriente se refiere a un método en el que el líquido se envía desde el lado de permeado al lado de la alimentación de la membrana de separación, eliminando así los productos que ensucian la superficie de la membrana.

El agua a alta temperatura utilizada como líquido de lavado a contracorriente no está particularmente limitada, siempre que no esté contaminada por microbios y no contenga sustancias que tengan el riesgo de ensuciar la membrana.

50 El agua a alta temperatura puede suministrarse usando una unidad de temperatura constante o usando un calentador provisto de una tubería de suministro de agua. Es preferible verificar la temperatura del agua a alta temperatura con un termómetro y controlar la temperatura entre $\pm 1^\circ\text{C}$ de la temperatura preestablecida.

La velocidad de suministro del agua a alta temperatura es deseablemente de 1 a 3 veces el flujo de permeación de la membrana, o puede fijarse en una velocidad más apropiada teniendo en cuenta factores tales como la concentración de microbios y el efecto de lavado de la membrana.

55 El agua a alta temperatura de la presente invención puede contener agentes de lavado, específicamente, agentes oxidantes como hipoclorito de sodio, dióxido de cloro, ozono y peróxido de hidrógeno, y ajustadores de pH como hidróxido de sodio, hidróxido de calcio, ácido clorhídrico y ácido sulfúrico, siempre que dicha adición no inhiba los

efectos de la presente invención. Además, se puede usar agua a alta temperatura que contenga una materia prima de fermentación para evitar que se reduzca la concentración de la materia prima de fermentación en el medio de cultivo.

5 En la presente invención, se envía un líquido desde el lado de permeado al lado de la alimentación del módulo de membrana mientras se mantiene alta la temperatura del líquido de lavado a contracorriente, lavando así la membrana y controlando la concentración de microbios. Cuando el líquido de lavado a contracorriente a alta temperatura es agua, el agua a alta temperatura facilita la separación de los materiales adheridos de la membrana de separación, y la proliferación de los microbios se detiene al entrar en contacto con el agua a alta temperatura.

10 Se considera que el agua a alta temperatura ayuda a la separación de las sustancias adheridas de la membrana de separación y, cuando la sustancia adherida a la membrana es una sustancia derivada de carbohidratos, el agua a alta temperatura crea un entorno en el que la sustancia adherida puede disolverse fácilmente. La sustancia adherida a la membrana puede disolverse así en el agua a alta temperatura. Por otro lado, cuando la sustancia adherida a la membrana es una sustancia derivada de proteínas, el agua a alta temperatura desnaturaliza la proteína y cambia las características de la adhesión a la membrana, lo que facilita la separación de la sustancia de la membrana.

15 Cuando el agua a alta temperatura es la que contiene el agente de lavado, la separación de la membrana puede ser promovida por los componentes derivados de las sustancias adheridas a la membrana. Por ejemplo, el hipoclorito de sodio como ejemplo del agente de lavado es un agente oxidante fuerte y, cuando se usa como agente oxidante a alta temperatura para el lavado a contracorriente, se promueve el efecto de oxidación de las sustancias derivadas de carbohidratos adheridas a la membrana, obteniendo así un efecto de lavado de membrana mayor que el proporcionado solo por el agua a alta temperatura. Por otro lado, el hidróxido de sodio y el hidróxido de calcio como ejemplos del agente de lavado son agentes alcalinos fuertes y, cuando se usan como álcali a alta temperatura para el lavado a contracorriente, se promueve el efecto de desnaturalización de la sustancia derivada de proteínas adherida a la membrana, obteniendo así un efecto de lavado de membrana mayor que el proporcionado solo por el agua a alta temperatura. Debe tenerse en cuenta que, aunque estos agentes oxidantes fuertes y los agentes alcalinos fuertes utilizados a altas temperaturas permiten el control de la proliferación de microbios, la adición de agua a alta temperatura puede presentar el riesgo de desactivar los microbios o aumentar rápidamente la tasa de destrucción de los microbios cuando la concentración excede un cierto intervalo. Por lo tanto, es importante que el agente de lavado se use en un intervalo de concentración que permita el lavado de la membrana y el control de las concentraciones de microbios.

20 En la presente invención, usar el agente de lavado en el intervalo que no inhibe los efectos de la presente invención significa usar preferiblemente, por ejemplo, un líquido de lavado que tenga una concentración efectiva de cloro de 1 a 5.000 ppm en el caso de hipoclorito de sodio, y preferiblemente, por ejemplo, un líquido de lavado que tiene un pH de 10 a 13 en el caso de hidróxido de sodio e hidróxido de calcio. Concentraciones por encima de este intervalo tienen posibles daños a la membrana de separación o posibles efectos adversos sobre los microbios. Concentraciones por debajo de este intervalo aumentan la preocupación sobre la disminución del efecto de lavado de la membrana.

25 El ciclo de lavado a contracorriente del agua a alta temperatura utilizada como líquido de lavado a contracorriente puede determinarse a partir de la presión transmembrana y de los cambios en la presión transmembrana. El ciclo de lavado a contracorriente está en el intervalo de 0,1 a 12 ciclos/hora, más preferiblemente de 3 a 6 ciclos/hora. Un ciclo de lavado a contracorriente por encima de estos intervalos tiene el posible riesgo de desactivar los microbios al añadir el agua a alta temperatura o aumentar rápidamente la tasa de destrucción de microbios. Por debajo de estos intervalos, el efecto de lavado y el efecto de control de microbios pueden no obtenerse suficientemente.

30 El tiempo de lavado a contracorriente para el agua a alta temperatura utilizada como líquido de lavado a contracorriente puede determinarse a partir del ciclo de lavado a contracorriente, la presión transmembrana y los cambios en la presión transmembrana. El tiempo de lavado a contracorriente está en un intervalo de 5 a 300 segundos/ciclo, más preferiblemente de 30 a 180 segundos/ciclo. Un tiempo de lavado a contracorriente por encima de estos intervalos tiene el posible riesgo de desactivar los microbios al añadir el agua a alta temperatura o aumentar rápidamente la tasa de destrucción de microbios. Por debajo de estos intervalos, el efecto de lavado y el efecto de control de microbios pueden no obtenerse suficientemente.

35 Las tuberías y válvulas utilizadas para un depósito de temperatura constante, una bomba de lavado a contracorriente de agua a alta temperatura y entre un depósito de temperatura constante y el módulo pueden seleccionarse de aquellas que tienen una excelente resistencia al calor. El agua a alta temperatura puede inyectarse manualmente o, más deseablemente, automáticamente controlando una bomba de filtro y una válvula de filtro, y una bomba de lavado a contracorriente de agua a alta temperatura y una válvula de lavado a contracorriente de agua a alta temperatura usando una unidad de control de filtración y lavado a contracorriente, usando un temporizador o similar.

40 La presente invención requiere monitorizar las concentraciones de microbios para el control de la concentración de microbios en el fermentador. Las concentraciones de microbios se pueden medir recogiendo una muestra. Sin embargo, es más deseable monitorizar continuamente los cambios en la concentración de microbios utilizando un sensor de concentración de microbios, por ejemplo, como un dispositivo de medición MLSS, instalado en el fermentador.

El dispositivo de fermentación continua usado en la presente invención se describe a continuación con referencia a los dibujos adjuntos.

La Fig. 1 es una vista lateral esquemática que explica un ejemplo de un dispositivo de fermentación continua usado en el método de suministro de agua a alta temperatura de la presente invención. El dispositivo de fermentación continua representado en la Fig. 1 es un ejemplo representativo en el que el módulo de membrana de separación está instalado fuera del fermentador. En la Fig. 1, el dispositivo de fermentación continua está configurado básicamente a partir de un fermentador 1, un módulo de membrana de separación 2 y una unidad de suministro de agua a alta temperatura. Están incorporadas grandes cantidades de membranas de fibra hueca en el módulo 2 de membrana de separación. Una unidad de suministro de agua a temperatura normal está configurada a partir de una bomba 13 de lavado a contracorriente de agua a temperatura normal y una válvula 16 de lavado a contracorriente de agua a temperatura normal. La unidad de suministro de agua a alta temperatura está configurada desde una bomba 12 de lavado a contracorriente de agua a alta temperatura y una válvula 15 de lavado a contracorriente de agua a alta temperatura. Una unidad de filtro está configurada a partir de una bomba 11 de filtro y una válvula 14 de filtro. El módulo de membrana de separación y la unidad de suministro de agua a alta temperatura se describirán más adelante en detalle. El módulo 2 de membrana de separación está conectado al fermentador 1 a través de una bomba 8 de circulación.

En la Fig. 1, una unidad 6 de control de sensor de nivel y una bomba 9 de suministro de medio pueden cargar un medio en el fermentador 1 para controlar el nivel de líquido en el fermentador y, según sea necesario, un agitador 4 puede agitar el medio de cultivo en el fermentador 1. La unidad 17 de suministro de gas puede suministrar el gas necesario, según sea necesario. Aquí, el gas suministrado puede ser suministrado de nuevo por la unidad 17 de suministro de gas después de ser recogido y reciclado. Además, según sea necesario, una unidad 5 de control del sensor de pH y una bomba 10 de suministro de ajustador de pH pueden ajustar el pH del medio de cultivo de fermentación para producir productos de fermentación con alta productividad.

En el dispositivo, la bomba 8 de circulación hace circular el medio de cultivo de fermentación entre el fermentador 1 y el módulo 2 de membrana de separación. El medio de cultivo de fermentación que contiene el producto de fermentación puede extraerse del dispositivo después de filtrarse y separarse en los microbios y la fermentación. producto con el módulo 2 de membrana de separación. Los microbios separados permanecen en el dispositivo y, por lo tanto, pueden mantenerse a altas concentraciones en el mismo, lo que hace posible producir productos de fermentación con alta productividad. La filtración y separación por el módulo 2 de membrana de separación pueden llevarse a cabo usando la presión de la bomba 8 de circulación, sin requerir una potencia especial. Sin embargo, se puede disponer opcionalmente una bomba 11 de filtro, y se puede usar una unidad 7 de control del sensor de presión diferencial para ajustar apropiadamente la cantidad del filtrado. Según se requiera, se puede usar una unidad 3 de control de temperatura para mantener constante la temperatura del fermentador 1 y mantener altas concentraciones de microbios.

La unidad de suministro de agua a alta temperatura utilizada en el método de suministro de agua a alta temperatura en la presente invención está configurada a partir de la bomba 12 de lavado a contracorriente de agua a alta temperatura y la válvula 15 de lavado a contracorriente de agua a alta temperatura. El agua a alta temperatura se puede introducir mientras se monitorizan las concentraciones de microbios.

El control en el método de operación de la presente invención se lleva a cabo según el procedimiento representado en la Fig. 2.

El procedimiento comienza con la filtración por membrana del medio de cultivo, y se monitorizan los cambios en la concentración de microbios y la presión transmembrana. La concentración de microbios se verifica cuando la presión transmembrana aumenta como resultado del ensuciamiento de la membrana en la filtración de la membrana, y se lleva a cabo un lavado a contracorriente con agua a alta temperatura cuando la concentración excede la concentración esperada de microbios.

La concentración de microbios se verifica al aumentar la presión transmembrana y, cuando la concentración está por debajo de la concentración de microbios esperada, se lleva a cabo un lavado a contracorriente con agua a temperatura normal que tiene una temperatura no mayor que la temperatura de cultivo.

Después del lavado de la membrana con agua a alta temperatura o con agua a temperatura normal a una temperatura no mayor que la temperatura de cultivo, se verifica la presión transmembrana y se confirma el efecto de lavado. Cuando la presión transmembrana excede la presión transmembrana de referencia esperada, la concentración de microbios se verifica nuevamente. El lavado a contracorriente puede detenerse cuando la presión transmembrana esté por debajo de la presión transmembrana de referencia esperada. La presión transmembrana de referencia esperada puede determinarse por las propiedades de la membrana de separación y las propiedades del módulo de membrana de separación.

El lavado a contracorriente llevado a cabo con el agua a alta temperatura de la manera descrita anteriormente hace posible lavar los componentes que ensucian la membrana de separación sin generar un líquido residual, y controlar la concentración de los microbios proliferados en exceso. El método de suministro de agua a alta temperatura que

permite mantener el rendimiento del filtro y el control de las concentraciones de microbios puede llevarse a cabo para mejorar el rendimiento de filtro del módulo de membrana y permitir una operación de filtración estable durante largos períodos de tiempo en la filtración de un medio de cultivo microbiano.

Ejemplos

5 Ejemplo 1

Primero, se fabricó el módulo de membrana. La membrana de fibra hueca utilizada para la fabricación del módulo de membrana se preparó desmontando el módulo de membrana de fibra hueca de poli(fluoruro de vinilideno) de presión de Toray HFS1020, y cortando solo la parte de la membrana de fibra hueca de poli(fluoruro de vinilideno) no unida y fijada al módulo. Se usó un producto moldeado de resina de policarbonato como miembro del módulo de membrana de separación. El módulo de membrana tenía un volumen de 0,06 l y un área efectiva de filtro de 200 cm². La membrana de fibra hueca porosa y el módulo de membrana fabricado de esta manera se utilizaron para llevar a cabo una fermentación continua. Las condiciones de operación utilizadas en el Ejemplo 1 son las siguientes, a menos que se indique lo contrario.

Condiciones de operación

- 15 – Volumen del fermentador: 2,0 l
- Volumen efectivo del fermentador: 1,5 l
- Membrana de separación utilizada: membrana de fibra hueca de poli(fluoruro de vinilideno) (60 fibras)
- Temperatura ajustada: 37°C
- Cantidad de aireación a través del fermentador: 0,2 l/min.
- 20 – Velocidad de agitación del fermentador: 600 rpm.
- pH ajustado: pH 6 con NaOH 3N
- Velocidad de suministro del medio de fermentación de ácido láctico: controlado de forma variable en un intervalo de 15 a 300 ml/h
- Cantidad de circulación de líquido por medio de cultivo circulador: 3,5 l/min.
- 25 – Control de la cantidad del flujo del filtro de membrana: la cantidad del flujo se controló con una bomba de succión
- Esterilización: el fermentador y el medio, incluido el módulo de membrana, se esterilizaron todos bajo vapor a alta temperatura con un autoclave durante 20 minutos a 121°C.

30 Se usó *Sprolactobacillus laevolacticus* JCM2513 (cepa SL) como microbios, y se usó como medio el medio de fermentación de ácido láctico de la composición presentada en la Tabla 1. La concentración del ácido láctico producto se evaluó en las siguientes condiciones, utilizando la HPLC a continuación.

Tabla 1

Medio de fermentación de ácido láctico

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

- Columna: Shim-Pack SPR-H (Shimadzu)
- Fase móvil: ácido p-toluensulfónico 5 mM (0,8 ml/min)
- Fase de reacción: ácido p-toluenosulfónico 5 mM, bistris 20 mM, EDTA·2Na 0,1 mM (0,8 ml/min)
- Método de detección: conductividad eléctrica

5 – Temperatura de columna: 45°C

La pureza óptica del ácido láctico se analizó en las siguientes condiciones.

- Columna: TSK-gel Enantio L1 (Tosoh)
- Fase móvil: solución acuosa de sulfato de cobre 1 mM
- Cantidad de flujo: 1,0 ml/min

10 – Método de detección: UV 254 nm

- Temperatura: 30°C

La pureza óptica del ácido L-láctico se calcula según la siguiente ecuación (i).

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

La pureza óptica del ácido D-láctico se calcula según la siguiente ecuación (ii).

15
$$\text{Pureza óptica (\%)} = 100 \times (D - L)/(D + L) \quad (\text{ii})$$

En las ecuaciones, L representa la concentración del ácido L-láctico y D representa la concentración del ácido D-láctico.

Para el cultivo, la cepa SL se agitó y se cultivó durante la noche en un tubo de ensayo que contenía un medio de fermentación de ácido láctico de 5 ml (primer precultivo). El medio de cultivo resultante se inoculó en un medio de fermentación de ácido láctico nuevo (100 ml), y se agitó y cultivó durante 24 horas a 37°C en un matraz Sakaguchi de 500 ml (segundo precultivo). El segundo medio de precultivo se inoculó en un medio en un fermentador de 1,5 litros del dispositivo de fermentación continua que se muestra en la Fig. 1, y se agitó con el agitador 4. Después de ajustar la cantidad de la aireación a través del fermentador 1, y la temperatura y el pH, el cultivo se desarrolló durante 50 horas sin operar la bomba 8 de circulación (precultivo final). Inmediatamente después del precultivo final, se hizo funcionar la bomba 8 de circulación, y el medio de fermentación de ácido láctico se suministró continuamente bajo las condiciones operativas de precultivo final mientras se controlaba adicionalmente la cantidad de permeado a través de la membrana para que la cantidad del medio de cultivo en el dispositivo de fermentación continua con separación de membrana se convierte en 1,5 l. El cultivo continuo produjo ácido D-láctico mediante fermentación continua. En la prueba de fermentación continua, la cantidad del permeado a través de la membrana se controló midiendo la cantidad del filtrado que sale de la bomba 11 de filtro, y variando la cantidad de filtrado a través de la membrana en condiciones controladas. El ácido D-láctico producto en el medio de cultivo filtrado por membrana se midió adecuadamente para determinar la concentración y la pureza óptica.

La operación de filtración de fermentación continua se llevó a cabo durante 250 horas. La operación de filtración por membrana se llevó a cabo con la bomba 11 de filtro. La cantidad del flujo de filtración fue cero desde la hora 0 hasta la hora 50, 100 ml/h desde la hora 50 hasta la hora 200, y 135 ml/h desde la hora 200 hasta la hora 250. La filtración se llevó a cabo durante 9 minutos en un ciclo repetido, seguido cada vez de una pausa de 1 minuto. El lavado a contracorriente se continuó desde la hora 50 hasta la hora 250 de la filtración, y luego durante 1 minuto a una cantidad de flujo de 600 ml/h después de 9 minutos de filtración. El agua a alta temperatura utilizada para el lavado a contracorriente se preparó cargando agua destilada en la unidad de temperatura constante y manteniendo constante la temperatura del agua. El agua a alta temperatura utilizada para el lavado a contracorriente se mantuvo a 90°C según el ajuste de temperatura de la unidad de temperatura constante, y se usó para la fermentación continua desde la hora 200 hasta la hora 250. Se usó agua a temperatura normal para el lavado a contracorriente en otros tiempos cuando no se usó agua a alta temperatura. Dado que la concentración de microbios en el fermentador tiende a disminuir el rendimiento del filtro cuando se incrementa, la operación se llevó a cabo a una concentración de microbios que se espera que mantenga adecuadamente la velocidad de filtración y la productividad. La presión transmembrana se midió una vez al día con un medidor de presión diferencial, mientras que la concentración de microbios se midió una vez al día tomando una OD600. Para la medición de OD600, se recogió primero una muestra del fermentador y se diluyó con una solución salina fisiológica para hacer que la muestra OD600 1 o menor. Luego se midió la absorbancia a una longitud de onda de 600 nm con un espectrofotómetro (UV-2450; Shimadzu Corporation). El valor medido se multiplicó por el factor utilizado para la dilución con la solución salina fisiológica, y el producto del cálculo se obtuvo como la

muestra OD600. Los resultados de los experimentos se presentan en las Figs. 3 y 4. Como resultado, fue posible reducir la concentración de microbios a una OD600 de aproximadamente 20, y mantener de forma estable la presión transmembrana. En otras palabras, el lavado efectivo de la membrana fue posible bajo concentraciones controladas de microbios.

5 Ejemplo 2

Se llevó a cabo una prueba de fermentación continua para ácido D-láctico de la misma manera que en el Ejemplo 1, excepto que se usó agua a alta temperatura para el lavado a contracorriente para la fermentación continua desde la hora 200 hasta la hora 250 después de mantenerse a 60°C según el ajuste de temperatura de la unidad de temperatura constante. Los resultados se presentan en las Figs. 3 y 4. Como resultado, fue posible reducir la concentración de microbios a una OD600 de aproximadamente 30, y mantener de forma estable la presión transmembrana. En otras palabras, el lavado efectivo de la membrana fue posible bajo concentraciones controladas de microbios.

Ejemplo 3

Se llevó a cabo una prueba de fermentación continua para ácido D-láctico de la misma manera que en el Ejemplo 1, excepto que se usó agua a alta temperatura para el lavado a contracorriente para la fermentación continua desde la hora 200 hasta la hora 250 después de mantenerse a 45°C según el ajuste de temperatura de la unidad de temperatura constante. Los resultados se presentan en las Figs. 3 y 4. Como resultado, fue posible reducir la concentración de microbios a una OD600 de aproximadamente 40, y mantener de forma estable la presión transmembrana. En otras palabras, el lavado efectivo de la membrana fue posible bajo concentraciones controladas de microbios.

Ejemplo 4

Se llevó a cabo una fermentación continua para microbios que producen ácido pirúvico, utilizando el mismo módulo de membrana utilizado en el Ejemplo 1. Específicamente, se usó la cepa P120-5a (FERM P-16745) de la levadura *Torulopsis glabrata* como los microbios productores de ácido pirúvico.

Se llevó a cabo una prueba de fermentación continua con el dispositivo de fermentación continua de la Fig. 1. El medio de fermentación de ácido pirúvico de la composición presentada en la Tabla 2 se usó como medio de fermentación. Se usó el medio de fermentación de ácido pirúvico después de esterilizarse bajo vapor a alta presión durante 20 minutos a 121°C. La operación se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones, a menos que se indique lo contrario.

Tabla 2

Medio de fermentación de ácido pirúvico

Componentes	Concentración
Glucosa	100 g/l
Sulfato de amonio	5 g/l
Dihidrógeno fosfato de potasio	1 g/l
Sulfato de magnesio heptahidratado	0,5 g/l
Hidrolizado de soja	2 g/l
Ácido nicotínico	8 mg/l
Piridoxina-clorhidrato	1 mg/l
Biotina	0,05 mg/l
Clorhidrato de tiamina	0,05 mg/l

* pH = 5,5

30 Condiciones de operación

- Volumen del fermentador: 2,0 l
- Volumen efectivo del fermentador: 1,5 l
- Membrana de separación: membrana de fibra hueca de poli(fluoruro de vinilideno) (60 fibras)
- Temperatura ajustada: 30°C
- 35 – Cantidad de aireación a través del fermentador: 1,5 l/min.

- Velocidad de agitación del fermentador: 800 rpm
 - pH ajustado: pH 5,5 con NaOH 4N
 - Velocidad de suministro del medio de fermentación del ácido pirúvico: Controlado de forma variable en un intervalo de 15 a 300 ml/h
- 5
- Cantidad de circulación de líquido con medio de cultivo circulador: 3,5 l/min.
 - Control de la cantidad de flujo de filtración de membrana: la cantidad de flujo se controló con una bomba de succión
 - Esterilización: el fermentador y el medio, incluido el módulo de membrana, se esterilizaron todos bajo vapor a alta temperatura con un autoclave durante 20 minutos a 121°C.
- 10
- La concentración de ácido pirúvico se evaluó mediante la medición por HPLC llevada a cabo en las siguientes condiciones.
- Columna: Shim-Pack SPR-H (Shimadzu)
 - Fase móvil: ácido p-toluensulfónico 5 mM (cantidad de flujo 0,8 ml/min)
- 15
- Líquido de reacción: ácido p-toluenosulfónico 5 mM, bistris 20 mM, EDTA·2Na 0,1 mM (cantidad de flujo 0,8 ml/min)
 - Método de detección: conductividad eléctrica
 - Temperatura: 45°C

Para la medición de la concentración de glucosa se usó prueba de glucosa Wako C® (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.).

- 20
- Para el cultivo, se agitó la cepa P120-5a y se cultivó durante la noche en un tubo de ensayo que contenía un medio de fermentación de ácido pirúvico de 5 ml (primer precultivo). El medio de cultivo resultante se inoculó en un medio de fermentación de ácido pirúvico nuevo (100 ml) y se agitó y cultivó durante 24 horas a 30°C en un matraz Sakaguchi de 500 ml (segundo precultivo). El segundo medio de precultivo se inoculó en un medio de fermentación de ácido pirúvico de 1,5 l en el dispositivo de fermentación continua que se muestra en la Fig. 1, y el fermentador 1 se agitó con el agitador 4. Después de ajustar la cantidad de aireación a través del fermentador 1, y la temperatura y pH, el cultivo se desarrolló durante 24 horas sin operar la bomba 8 de circulación (precultivo final). Inmediatamente después del precultivo final, se hizo funcionar la bomba 8 de circulación, y el medio de fermentación de ácido pirúvico se suministró continuamente bajo las condiciones operativas de precultivo final mientras se controlaba adicionalmente la cantidad de permeado a través de la membrana para que la cantidad del medio de cultivo en el dispositivo de fermentación continua se convierte en 1,5 l. El cultivo continuo produjo ácido pirúvico mediante fermentación continua. En la prueba de fermentación continua, la cantidad de permeado a través de la membrana se controló midiendo la cantidad de filtrado que sale de la bomba 11 de filtro, y variando la cantidad de filtrado a través de la membrana en condiciones controladas. Se midieron adecuadamente las concentraciones del ácido pirúvico producto y la glucosa residual en el medio de cultivo filtrado por membrana.
- 25
- 30
- 35
- La operación de filtración de fermentación continua se llevó a cabo durante 250 horas. La operación de filtración por membrana se llevó a cabo con la bomba 11 de filtro. La cantidad del flujo de filtración fue cero desde la hora 0 hasta la hora 50, 100 ml/h desde la hora 50 hasta la hora 200, y 135 ml/h desde la hora 200 hasta la hora 250. La filtración se llevó a cabo durante 9 minutos en un ciclo repetido, seguido cada vez de una pausa de 1 minuto. El lavado a contracorriente se continuó desde la hora 50 hasta la hora 250 de la filtración, y luego durante 1 minuto a una cantidad de flujo de 600 ml/h después de 9 minutos de filtración. El agua a alta temperatura utilizada para el lavado a contracorriente se preparó cargando agua destilada en la unidad de temperatura constante y manteniendo constante la temperatura del agua. El agua a alta temperatura utilizada para el lavado a contracorriente se mantuvo a 50°C según el ajuste de temperatura de la unidad de temperatura constante, y se usó para la fermentación continua desde la hora 200 hasta la hora 250. Se usó agua a temperatura normal para el lavado a contracorriente en otros tiempos cuando no se usó agua a alta temperatura. Dado que la concentración de microbios en el fermentador tiende a disminuir el rendimiento del filtro cuando se incrementa, la operación se llevó a cabo a una concentración de microbios que se espera que mantenga adecuadamente la velocidad de filtración y la productividad. La presión transmembrana se midió una vez al día con un medidor de presión diferencial, mientras que la concentración de microbios se midió una vez al día tomando una OD600. Para la medición de la OD600, se recogió primero una muestra del fermentador y se diluyó con una solución salina fisiológica para hacer que la muestra OD600 1 o menor. Luego se midió la absorbancia a una longitud de onda de 600 nm con un espectrofotómetro (UV-2450; Shimadzu Corporation). El valor medido se multiplicó por el factor utilizado para la dilución con la solución salina fisiológica, y el producto del cálculo se obtuvo como la muestra OD600. Los resultados de los experimentos se presentan en las Figs. 5 y 6. Como resultado, fue posible
- 40
- 45
- 50

reducir la concentración de microbios a una OD600 de aproximadamente 55, y mantener de forma estable la presión transmembrana. En otras palabras, el lavado efectivo de la membrana fue posible bajo concentraciones controladas de microbios.

Ejemplo 5

5 Se llevó a cabo una prueba de fermentación continua para ácido pirúvico de la misma manera que en el Ejemplo 4, excepto que se usó el agua a alta temperatura para el lavado a contracorriente para la fermentación continua desde la hora 200 hasta la hora 250 después de mantenerse a 40°C según el ajuste de temperatura de la unidad de temperatura constante. Los resultados se presentan en las Figs. 5 y 6. Como resultado, fue posible reducir la concentración de microbios a una OD600 de aproximadamente 65, y mantener de forma estable la presión transmembrana. En otras palabras, el lavado efectivo de la membrana fue posible bajo concentraciones controladas de microbios.

Ejemplo comparativo 1

15 Se llevó a cabo una prueba de fermentación continua para ácido D-láctico de la misma manera que en el Ejemplo 1, sin lavado a contracorriente con el agua a alta temperatura. Sin embargo, para tener en cuenta la posible dilución del medio de cultivo con el agua a alta temperatura utilizada para el lavado a contracorriente, se introdujo agua a través de una entrada de medio en la misma cantidad que la utilizada en el Ejemplo 1 para el agua a alta temperatura en el lavado a contracorriente. Los resultados se presentan en las Figs. 3 y 4. La OD600 aumentó hasta aproximadamente 90 después de 250 horas de fermentación continua, y no fue posible controlar la concentración de microbios. Además, la presión transmembrana aumentó, y no fue posible una operación de filtración con fermentación continua estable.

20 Ejemplo comparativo 2

25 Se llevó a cabo una prueba de fermentación continua para ácido D-láctico de la misma manera que en el Ejemplo 1, usando el agua a alta temperatura para el lavado a contracorriente después de establecer la temperatura del agua de lavado a 35°C. Los resultados se presentan en las Figs. 3 y 4. La OD600 aumentó hasta aproximadamente 70 después de 250 horas de fermentación continua, y no fue posible controlar la concentración de microbios. Además, la presión transmembrana aumentó, y no fue posible una operación de filtración con fermentación continua estable.

Ejemplo comparativo 3

30 Se llevó a cabo una prueba de fermentación continua para ácido pirúvico de la misma manera que en el Ejemplo 4, excepto que la fermentación continua se llevó a cabo de la hora 200 a la hora 250 con el agua a alta temperatura para el lavado a contracorriente después de ajustar la temperatura del agua a 25°C según al ajuste de temperatura de la unidad de temperatura constante. Los resultados se presentan en las Figs. 5 y 6. La OD600 aumentó hasta aproximadamente 85 después de 250 horas de fermentación continua, y no fue posible controlar la concentración de microbios. Además, la presión transmembrana aumentó, y no fue posible una operación de filtración con fermentación continua estable.

Aplicabilidad industrial

35 La presente invención proporciona un método de operación sencillo que permite lavar de forma efectiva los componentes que ensucian la membrana resultantes de la filtración de membrana y controlar las concentraciones de microbios en un fermentador. La invención también puede mejorar en gran medida la eficiencia de la producción de fermentación de forma estable y económica, y puede reducir los costes mediante la reducción de los costes de tratamiento resultantes de un líquido de lavado de residuos y un medio de cultivo retirado. Por lo tanto, la invención puede producir de manera estable productos de fermentación a bajo coste en una amplia gama de industrias de fermentación.

Descripción de números y signos de referencia

- 1 Fermentador
- 2 Módulo de membrana de separación
- 45 3 Unidad de control de temperatura
- 4 Agitador
- 5 Unidad de control del sensor de pH
- 6 Unidad de control de sensor de nivel
- 7 Unidad de control del sensor de presión diferencial
- 50 8 Bomba de circulación

ES 2 795 837 T3

- 9 Bomba de suministro de medio
- 10 Bomba de suministro del ajustador de pH
- 11 Bomba de filtro
- 12 Bomba de lavado a contracorriente de agua a alta temperatura
- 5 13 Bomba de lavado a contracorriente de agua a temperatura normal
- 14 Válvula de filtro
- 15 Válvula de lavado a contracorriente de agua a alta temperatura
- 16 Válvula de lavado a contracorriente de agua a temperatura normal
- 17 Unidad de suministro de gas

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir productos químicos mediante fermentación continua, comprendiendo el método:
 - (a) generar productos químicos por fermentación con un medio de cultivo que contiene una materia prima de fermentación y microbios o células cultivadas a una temperatura de 15°C a 65°C en un fermentador;
 - (b) filtrar el medio de cultivo a través de una membrana de separación;
 - (c) recoger el producto químico del filtrado;
 - (d) retener o refluir los restos sin filtrar en el fermentador,
 - (e) añadir una materia prima de fermentación al medio de cultivo en el fermentador, y
 - (f) lavar la membrana de separación con un líquido de lavado suministrado desde el lado del permeado de la membrana de separación durante la etapa (a) en un estado en el que la fermentación con los microbios o las células cultivadas continúa en el medio de cultivo en el fermentador;
- 5 en donde el líquido de lavado es agua que tiene una temperatura al menos 5°C mayor que la temperatura del medio de cultivo en el fermentador de la etapa (a) hasta una temperatura máxima del agua de lavado de 100°C, y la concentración de los microbios en el fermentador se controla suministrando el líquido de lavado.
- 10 2. El método para producir productos químicos mediante fermentación continua según la reivindicación 1, en donde el líquido de lavado contiene un agente oxidante.
- 15 3. El método para producir productos químicos mediante fermentación continua según la reivindicación 2, en donde el agente oxidante contiene al menos un agente oxidante seleccionado del grupo que consiste en hipoclorito, dióxido de cloro, ozono y peróxido de hidrógeno.
- 20 4. El método para producir productos químicos mediante fermentación continua según la reivindicación 1, en donde el líquido de lavado contiene un ajustador de pH.
5. El método para producir productos químicos mediante fermentación continua según la reivindicación 1, en donde el líquido de lavado contiene la materia prima de fermentación.

Fig. 1

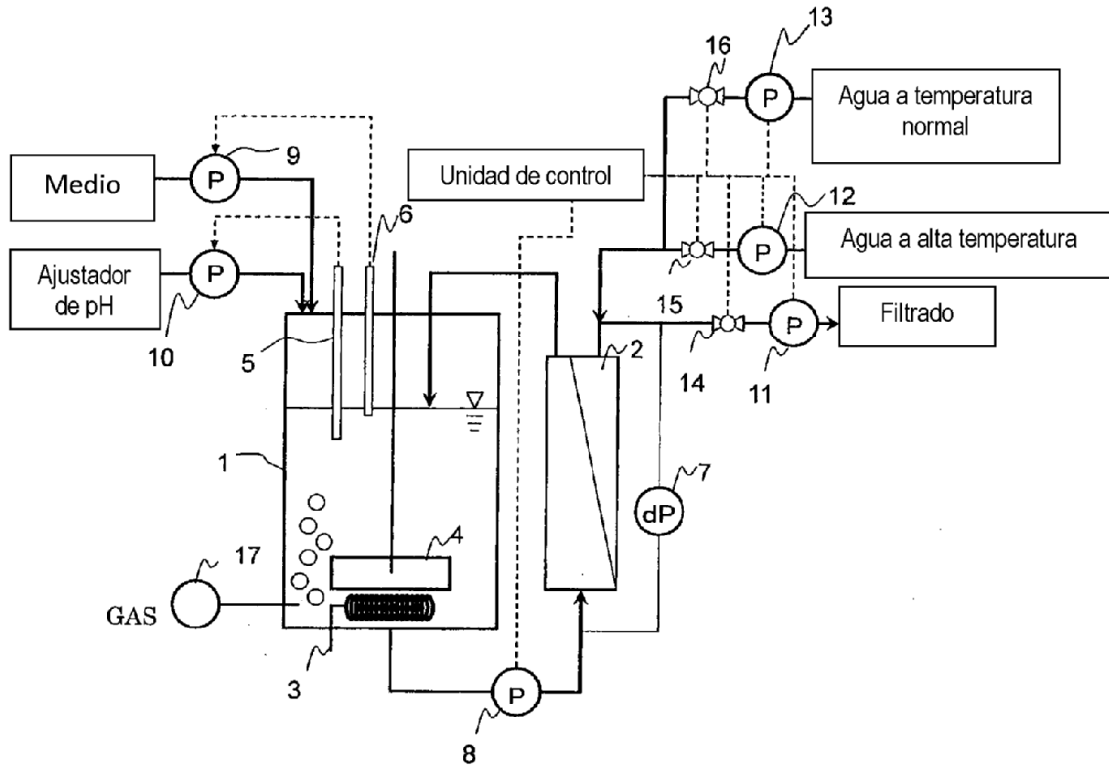


Fig. 2

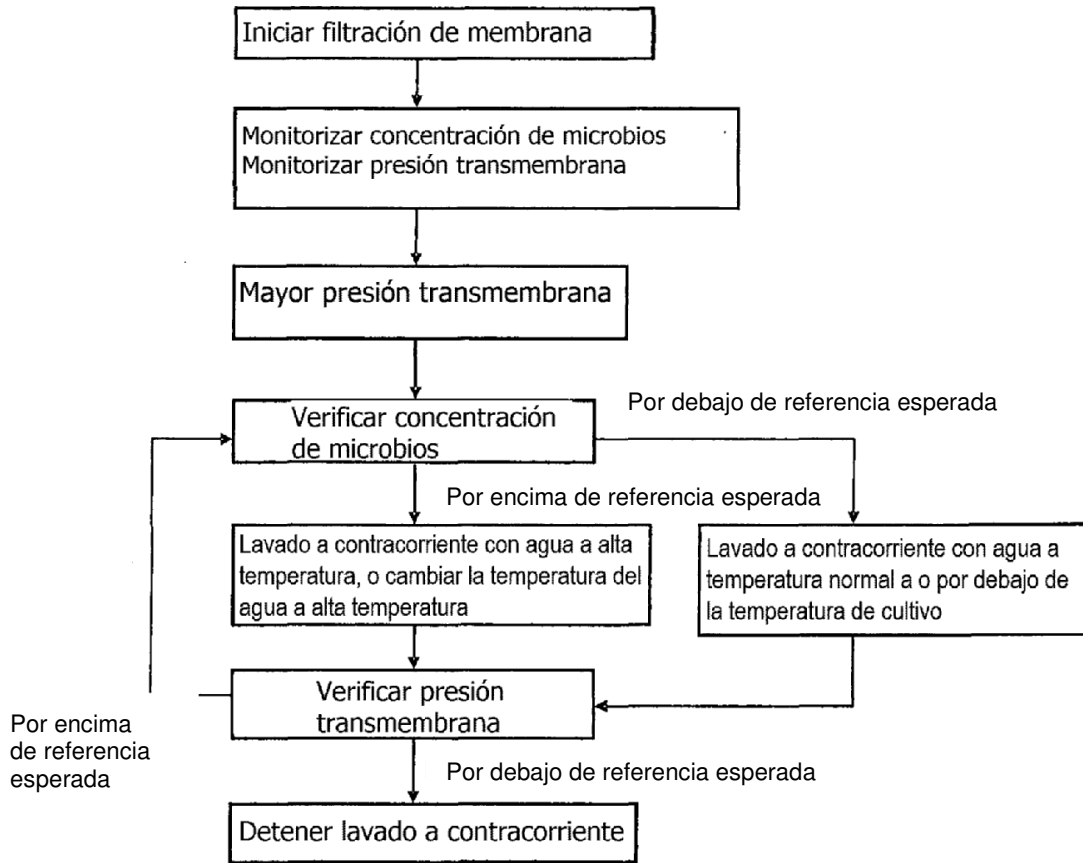


Fig. 3

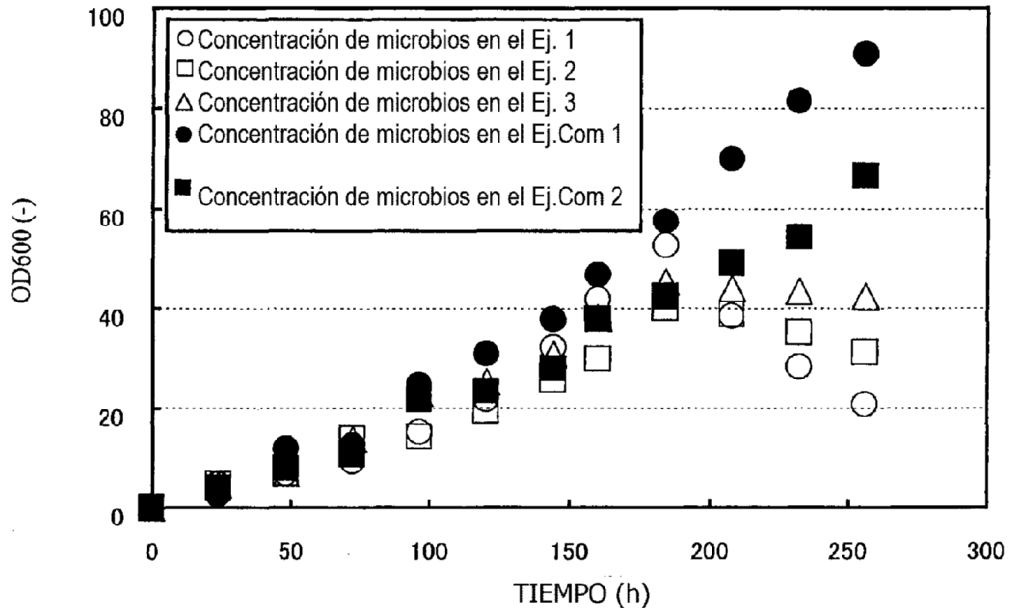


Fig. 4

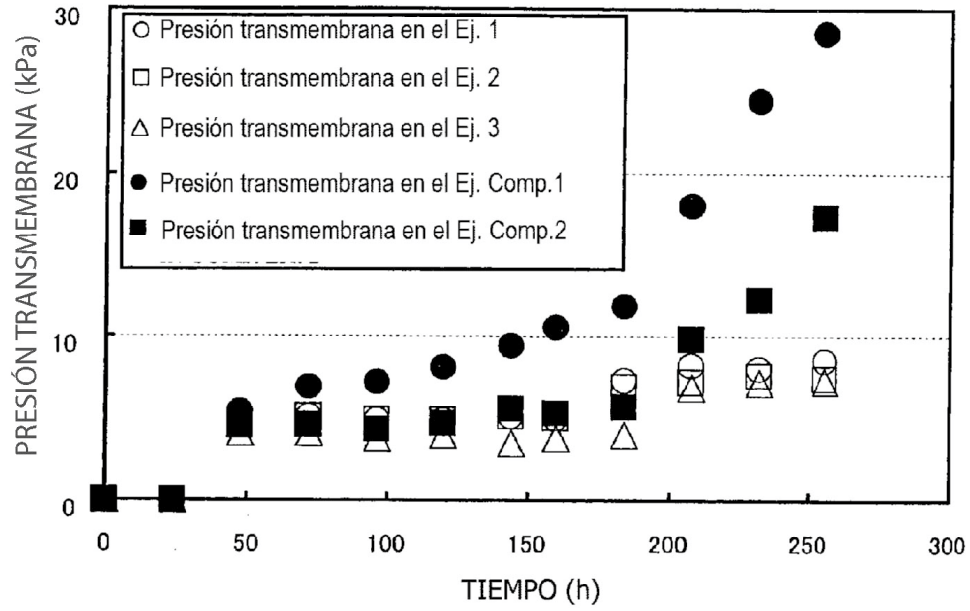


Fig. 5

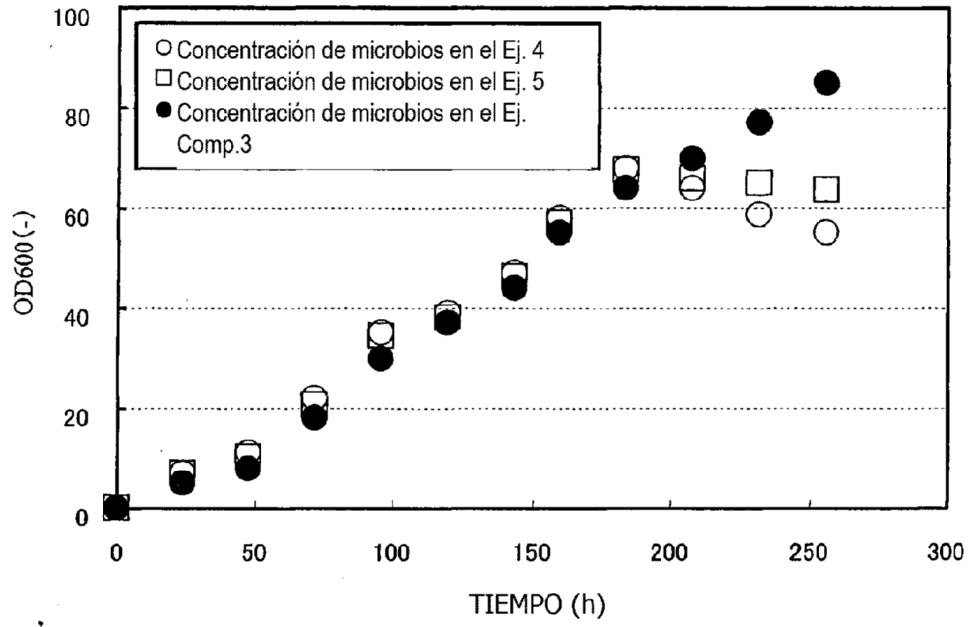


Fig. 6

