

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) **PI0707027-6 A2**

(22) Data de Depósito: 16/02/2007
(43) Data da Publicação: 19/04/2011
(RPI 2102)



(51) Int.Cl.:

C12P 7/56
C12M 1/12
C12P 7/06
C12P 7/46
C12P 7/50
C12P 13/00
C12P 13/08
C12P 19/30
C12N 15/09

(54) Título: **MÉTODO DE FABRICAÇÃO DE PRODUTO QUÍMICO E APARELHOS DE FERMENTAÇÃO CONTÍNUA**

(30) Prioridade Unionista: 24/02/2006 JP 2006-048181,
26/07/2006 JP 2006-203072

(73) Titular(es): Toray Industries, Inc.

(72) Inventor(es): Hideki Sawai, Katsushige Yamada, Kenji Sawai,
MASAHIRO HENMI, Takashi Mimitsuka, Tetsu Yonehara, YOHITO
ITO

(74) Procurador(es): Kátia Jane Ferreira

(86) Pedido Internacional: PCT JP2007052853 de 16/02/2007

(87) Publicação Internacional: WO WO 2007/097260de
30/08/2007

(57) Resumo: MÉTODO DE FABRICAÇÃO DE PRODUTO QUÍMICO E APARELHOS DE FERMENTAÇÃO CONTÍNUA. A presente invenção fornece método de fabricação de produto químico por meio de fermentação contínua, que inclui a filtragem de cultivo de microorganismo ou células cultivadas com membrana de separação para recuperar produto de filtrado, retenção simultânea de fluido não filtrado no cultivo ou envio para ele em refluxo e adição de materiais de fermentação ao cultivo, em que membrana porosa que possui tamanho médio de poro de 0,01 um ou mais a menos de 1 um é utilizada como membrana de separação e a filtragem é conduzida com diferença de pressão transmembrana na faixa de 0,1 a 20 kPa. Segundo este método, a produtividade de fermentação do produto químico pode ser grandemente elevada sob alta estabilidade e baixo custo.



“MÉTODO DE FABRICAÇÃO DE PRODUTO QUÍMICO E APARELHOS DE FERMENTAÇÃO CONTÍNUA”

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a método de fabricação de produto
5 químico e aparelho de fermentação contínua.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

O método de fermentação que é método de produção de
substância, que envolve o cultivo de microorganismo ou células cultivadas,
pode ser grosseiramente classificado em (1) método de fermentação em
10 bateladas ou método de fermentação em bateladas alimentadas e (2) método
de fermentação contínua.

O método de fermentação ou fermentação alimentada possui
vantagens tais como instalações simples e menos danos por bactérias
contaminantes por ser cultivo de curto prazo. A concentração de produto em
15 cultivo aumenta com o tempo, entretanto, para reduzir a produtividade e o
rendimento devido à influência de pressão osmótica ou inibição pelo produto.
Conseqüentemente, é difícil manter alto rendimento e alta produtividade de
forma estável por longo período.

O método de fermentação contínua é caracterizado pelo fato de
20 que alto rendimento e alta produtividade podem ser mantidos por longo
período, evitando acúmulo de substância objetiva em alta concentração em
fermentador. Foram descritos métodos de fermentação contínua para a
fermentação de ácido L-glutâmico e L-lisina (Documento Não de Patente 1).
Nestes exemplos, entretanto, materiais brutos são alimentados continuamente
25 a cultivo enquanto cultivo que contém microorganismos e células é retirado, de
forma que os microorganismos e as células no cultivo sejam diluídos e,
portanto, o aumento da eficiência de produção é limitado.

No método de fermentação contínua, propôs-se que

microorganismos e células cultivadas sejam filtrados com membrana de separação para recuperar produto de filtrado, enquanto os microorganismos filtrados e células cultivadas são retidos em cultivo ou para eles enviados em refluxo, de forma a manter alta densidade dos microorganismos e células cultivadas no cultivo.

Foram descritos, por exemplo, métodos de fermentação contínua em aparelho de fermentação contínua utilizando membrana de cerâmica (Documentos de Patente 1, 2 e 3). Os métodos descritos, entretanto, possuem problema na redução da velocidade de fluxo de filtração e eficiência de filtração causados pela obstrução da membrana de cerâmica e, para evitar esta obstrução, conduz-se lavagem reversa ou similar.

Foi descrito processo de produção de ácido succínico utilizando membrana de separação (Documento de Patente 4). Neste método, utiliza-se alta pressão de filtração (cerca de 200 kPa) em separação de membrana. Esta alta pressão de filtração não apenas apresenta desvantagem de custos, mas também causa danos físicos para os microorganismos e células por pressão em tratamento de filtração e, portanto, não é apropriada para fermentação contínua, em que microorganismos e células são devolvidos continuamente para cultivo.

Cultivo contínuo convencional é método de cultivo em que meio novo é alimentado em velocidade constante para fermentador e cultivo na mesma quantidade do meio é descarregado do fermentador, de forma a manter o volume de fluido no fermentador sempre constante. Em cultivo de bateladas, o cultivo é encerrado quando substrato inicial é consumido, enquanto, em cultivo contínuo, o cultivo pode teoricamente prosseguir infinitamente. Isso significa que a fermentação infinita é teoricamente viável.

No cultivo contínuo convencional, por outro lado, microorganismos junto com cultivo são descarregados de fermentador, de forma que a

densidade de microorganismos no fermentador dificilmente é mantida alta. Caso microorganismos de fermentação possam ser mantidos em alta densidade em produção de fermentação, a eficiência da produção de fermentação por volume de fermentação pode ser aumentada. Com este
5 propósito, os microorganismos deverão ser retidos em fermentador ou a ele conduzidos em refluxo. O método em que microorganismos são retidos em fermentador, ou a ele conduzidos em refluxo, inclui método que envolve a separação de sólidos e líquidos de cultivo descarregado por gravidade, tal como centrifugação, e retorno de microorganismos precipitados para
10 fermentador, bem como método que envolve filtração para separar microorganismos na forma de sólidos e descarga de sobrenadante de cultivo somente a partir de fermentador. O método que utiliza centrifugação, entretanto, não é prático devido ao alto custo de energia. O método que utiliza filtração necessita de alta pressão para filtração conforme descrito acima e foi
15 examinado principalmente em nível de laboratório.

Conforme descrito acima, os métodos de fermentação contínua convencionais sofrem vários problemas e dificilmente são industrialmente aplicáveis.

Isso significa que ainda é difícil no método de fermentação
20 contínua atingir alta produtividade de substâncias por meio da filtração de microorganismos e células com membrana de separação, de forma a recuperar produto de filtrado e causar refluxo simultâneo dos microorganismos e células para cultivo para aumentar a densidade dos microorganismos e células no cultivo e manter a sua densidade alta. Desta forma, tem havido demanda por
25 técnicas inovadoras.

Documento de Patente 1: Pedido de Patente Japonês em Aberto
nº 5-95778

Documento de Patente 2: JP-A Nº 62-138184

Documento de Patente 3: JP-A Nº 10-174594

Documento de Patente 4: JP-A Nº 2005-333886

Documento Não de Patente 1: Toshihiko Hirao et al, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 32, 269-273 (1989)

5

DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a método de fabricação de produto químico por meio de fermentação contínua, que inclui a filtração de cultivo de microorganismo ou células cultivadas com membrana de separação para recuperar produto de filtrado, retenção simultânea de fluido não filtrado no cultivo ou envio em refluxo para ele e adição de materiais de fermentação ao cultivo, em que membrana porosa que possui tamanho médio de poro de 0,01 μm ou mais a menos de 1 μm é utilizada como membrana de separação e a filtração é conduzida com diferença de pressão transmembrana na faixa de 0,1 a 20 kPa.

15

A presente invenção refere-se ao método de fabricação de produto químico, em que o coeficiente de permeabilidade a água purificada para a membrana porosa é de preferencialmente $2 \times 10^{-9} \text{ m}^3/\text{m}^2/\text{s}/\text{pa}$ ou mais a $6 \times 10^{-7} \text{ m}^3/\text{m}^2/\text{s}/\text{pa}$ ou menos.

A presente invenção refere-se ao método de fabricação de produto químico, em que o tamanho médio de poro da membrana porosa é de preferencialmente 0,01 μm ou mais a menos de 0,2 μm e o desvio padrão do tamanho de poro da membrana porosa é de preferencialmente 0,1 μm ou menos.

A presente invenção refere-se ao método de fabricação de produto químico, em que a membrana porosa é preferencialmente membrana porosa que possui aspereza de superfície de 0,1 μm ou menos.

A presente invenção refere-se ao método de fabricação de produto químico, em que a membrana porosa é preferencialmente membrana

porosa que contém camada de resina porosa.

Um aparelho de fermentação contínua de acordo com a presente invenção é aparelho de fabricação de produto químico por meio de fermentação contínua que inclui filtragem de cultivo de fermentação de microorganismo ou células cultivadas com membrana de separação para recuperar produto de filtrado, retenção simultânea de fluido não filtrado no cultivo, ou envio para ele em refluxo, e adição de materiais de fermentação ao cultivo de fermentação, que inclui tanque de reação de fermentação para cultivo de fermentação de microorganismo ou células cultivadas; tanque de separação de membrana para filtragem do cultivo de fermentação, que é conectado por meios de circulação de cultivo de fermentação para o tanque de retenção de fermentação e equipado no seu interior com membrana de separação; e meios de regulagem da diferença de pressão transmembrana da membrana de separação na faixa de 0,1 a 20 kPa, em que a membrana de separação possui tamanho médio de poro de 0,01 μm ou mais a menos de 1 μm .

Outro aparelho de fermentação contínua de acordo com a presente invenção é aparelho de fabricação de produto químico por meio de fermentação contínua que inclui filtragem de cultivo de fermentação de microorganismo ou células cultivadas com membrana de separação para recuperar produto de filtrado, retenção simultânea de fluido não filtrado no cultivo ou envio para ele em refluxo e adição de materiais de fermentação ao cultivo de fermentação, que incluem tanque de reação de fermentação para cultivo de fermentação de microorganismo ou células cultivadas; elemento de membrana de separação para filtragem do cultivo de fermentação, que é disposta no interior do tanque de reação de fermentação e nele equipado com membrana de separação; meios de descarga de produto de fermentação filtrado, que são conectados ao elemento de membrana de separação; e meios

de regulagem da diferença de pressão transmembrana da membrana de separação na faixa de 0,1 a 20 kPa, em que a membrana de separação é membrana porosa que possui tamanho médio de poro de 0,01 μm ou mais a menos de 1 μm .

5

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A Fig. 1 é vista lateral esquemática para exibir um exemplo do aparelho de fermentação contínua do tipo separação de membranas de acordo com a presente invenção.

10 A Fig. 2 é vista lateral esquemática para exibir outro exemplo do aparelho de fermentação contínua do tipo separação de membranas de acordo com a presente invenção.

A Fig. 3 é vista em perspectiva esquemática para exibir um exemplo do elemento de membrana de separação de acordo com a presente invenção.

15 A Fig. 4 é vista em seção cruzada para exibir outro exemplo do elemento de membrana de separação de acordo com a presente invenção.

A Fig. 5 exibe mapa físico do vetor de expressão de levedura pTRS11.

DESCRIÇÃO DOS ALGARISMOS DE REFERÊNCIA

20

- 1 Tanque de reação de fermentação
- 2 Elemento de membrana de separação
- 3 Aparelho de regulagem da diferença de cabeça d'água
- 4 Aparelho de alimentação de gás
- 5 Agitador
- 25 6 Sensor de nível
- 7 Bomba de alimentação de meio
- 8 Bomba de alimentação de solução reguladora de pH
- 9 Sensor/regulador de pH

- 10 Regulador de temperatura
- 11 Bomba de circulação de líquido de fermentação
- 12 Tanque de separação de membrana
- 13 Placa de sustentação
- 5 14 Material de passagem
- 15 Membrana de separação
- 16 Parte côncava
- 17 Cano de coleta de água
- 18 Feixe de membranas de separação
- 10 19 Camada de vedação de resina superior
- 20 Camada de vedação de resina inferior
- 21 Quadro de sustentação
- 22 Cano de coleta de água

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

15 A presente invenção refere-se a método de fabricação de produto químico por meio de fermentação contínua, que inclui a filtragem de cultivo de microorganismo ou células cultivadas com membrana de separação para recuperar produto de filtrado, retenção simultânea de fluido não filtrado no cultivo ou envio para ele em refluxo e adição de materiais de fermentação ao

20 cultivo, em que membrana porosa que possui tamanho médio de poro de 0,01 μm ou mais a menos de 1 μm é utilizada como membrana de separação e a filtragem é conduzida com diferença de pressão transmembrana na faixa de 0,1 a 20 kPa.

É descrita a membrana porosa utilizada como membrana de

25 separação na presente invenção.

É descrita a constituição da membrana porosa utilizada como membrana de separação na presente invenção. A membrana porosa de acordo com a presente invenção possui desempenho de separação e desempenho de

permeação de água, dependendo do uso pretendido e da qualidade de água da água a ser tratada.

A membrana porosa é preferencialmente membrana porosa que contém camada de resina porosa do ponto de vista de desempenho de prevenção, desempenho de permeação de água e desempenho de separação, tal como resistência à contaminação.

Preferencialmente, a membrana porosa que contém camada de resina porosa possui camada de resina porosa que desempenha papel em camada funcional de separação sobre a superfície de material base poroso. O material base poroso sustenta a camada de resina porosa para dar resistência à membrana de separação.

A membrana porosa utilizada na presente invenção contém camada de resina porosa preferencialmente sobre a superfície de material base poroso, em que a camada de resina porosa pode ou não penetrar no material base poroso, dependendo do uso.

A espessura média do material base poroso é de preferencialmente 50 ou mais a 3000 μm ou menos.

O material do material base poroso é elaborado com material orgânico e/ou material inorgânico e são desejavelmente utilizadas fibras orgânicas. O material base poroso é preferencialmente material tecido ou não tecido preparado com fibras orgânicas tais como fibras de celulose, fibras de triacetato de celulose, fibras de poliéster, fibras de polipropileno e fibras de polietileno. De maior preferência, utiliza-se material não tecido de baixo custo e fácil fabricação com densidade regulada de forma relativamente fácil.

Como a camada de resina porosa, pode-se preferencialmente utilizar membrana de polímero orgânico. O material da membrana de polímero orgânico inclui, por exemplo, resina de polietileno, resina de polipropileno, resina de cloreto de polivinila, resina de fluoreto de polivinilideno, resina de

polissulfona, resina de poliéter sulfona, resina de poliacrilonitrila, resina de celulose e resina de triacetato de celulose. A membrana de polímero orgânico pode ser mistura de resina que contém estas resinas como componente principal. O componente principal utilizado no presente designa componente
5 que está contido em quantidade de 50% em peso ou mais, preferencialmente 60% em peso ou mais. O material da membrana de polímero orgânico é preferencialmente resina que possui excelente durabilidade física e resistência química, cuja solução pode ser formada facilmente em membrana, tal como resina de cloreto de polivinila, resina de fluoreto de polivinilideno, resina de
10 polissulfona, resina de poliéter sulfona ou resina de poliacrilonitrila e é utilizada, de maior preferência, resina de polivinilideno ou resina que o contém como principal ingrediente.

Como a resina de fluoreto de polivinilideno, é preferencialmente utilizado homopolímero de fluoreto de vinilideno. Como resina de fluoreto de
15 polivinilideno, pode também ser preferencialmente utilizado copolímero de fluoreto de vinilideno e monômero de vinila com ele copolimerizável. O monômero de vinila copolimerizável com fluoreto de vinilideno pode ser exemplificado por tetrafluoroetileno, hexafluoropropileno e tricloreto cloreto de etileno.

20 É importante que a membrana porosa utilizada na presente invenção possua tamanho médio de poro de 0,01 μm ou mais a menos de 1 μm . Quando o tamanho médio de poro da membrana porosa for de 0,01 μm ou mais a menos de 1 μm , a membrana porosa dificilmente sofre obstrução com microorganismos utilizados em fermentação e possui desempenho de filtragem
25 que permanece estável por longo período. Além disso, quando o tamanho médio de poro da membrana porosa for de 0,01 μm ou menos a menos de 1 μm , alta taxa de exclusão em microorganismos ou evita-se o vazamento de células cultivadas e alta permeabilidade a água podem ser simultaneamente

satisfeitas e, desta forma, permeabilidade a água pode ser mantida por longo período com alta precisão e capacidade de reprodução.

O tamanho médio de poro da membrana porosa é de menos de 1 μm pois, quando o tamanho de poro estiver próximo do tamanho de microorganismo ou célula cultivada, o poro pode ser obstruído diretamente com o microorganismo ou célula cultivada. O tamanho médio de poro da membrana porosa preferencialmente não é grande demais em comparação com o tamanho de microorganismo ou célula cultivada, para evitar vazamento do microorganismo ou célula cultivada, ou seja, para evitar desvantagem de redução da taxa de exclusão. Quando o microorganismo ou célula cultivada for bactéria que contém célula pequena, o tamanho médio de poro é de preferencialmente 0,4 μm ou menos, particularmente menos de 0,2 μm para operação de maior preferência.

Microorganismo ou células cultivadas podem produzir substâncias diferentes de produto químico objetivo, tais como substâncias facilmente agregadas como proteínas e polissacarídeos, e parte dos microorganismos ou células cultivadas em cultivo pode perecer para formar células rompidas. Para evitar obstrução da membrana porosa com essas substâncias, o tamanho médio de poro é de preferencialmente 0,1 μm ou menos.

Geralmente, o tamanho médio de poro da membrana porosa é de preferencialmente 0,4 μm ou menos, de maior preferência menos de 0,2 μm , 0,1 μm ou menos.

Quando o tamanho médio de poro for pequeno demais, o desempenho de permeação de água da membrana porosa pode ser reduzido, de forma a tornar operação eficiente inviável, mesmo quando a membrana não estiver suja. Portanto, o tamanho médio de poro da membrana porosa de acordo com a presente invenção é de 0,01 μm ou mais, de maior preferência 0,02 μm ou mais, de preferência ainda maior 0,04 μm ou mais.

O tamanho médio de poro pode ser determinado por meio de medição dos diâmetros de todos os poros observáveis em área de 9,2 µm x 10,4 µm sob observação com microscópio eletrônico de varrimento em ampliação de x10.000 e, em seguida, calculando-se a média dos diâmetros medidos. Alternativamente, o tamanho médio de poro pode ser determinado tirando-se fotografia da superfície da membrana com microscópio eletrônico de varrimento em ampliação de x10.000, selecionando-se em seguida dez ou mais (preferencialmente, vinte ou mais) poros aleatoriamente, medindo-se os diâmetros dos poros selecionados e calculando-se a média numérica dos diâmetros medidos. Quando o poro não for circular, o tamanho médio de poro pode ser determinado por meio de método de determinação de círculo que possui área equivalente à do poro com processador de imagens ou similares e, considerando que o diâmetro do círculo equivalente é o diâmetro do poro, determina-se o tamanho médio de poro.

A derivação padrão σ do tamanho médio de poro da membrana porosa de acordo com a presente invenção é de preferencialmente 0,1 µm ou menos. O desvio padrão do tamanho médio de poro é desejavelmente mais baixo. O desvio padrão σ do tamanho médio de poro pode ser calculado utilizando a equação (1) a seguir:

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

em que N é o número de poros observável na área mencionada acima de 9,2 µm x 10,4 µm, X_k é o diâmetro de cada um dos poros medidos e $X(\text{ave})$ é o tamanho médio de poro.

Para a membrana porosa utilizada na presente invenção, a sua permeabilidade a cultivo é desempenho importante. Como indicador da

permeabilidade da membrana porosa, pode-se utilizar o coeficiente de permeabilidade a água purificada da membrana porosa antes do uso. Na presente invenção, o coeficiente de permeabilidade a água purificada da membrana porosa, conforme calculado por meio de medição, sob pressão superior de 1 m de água, a quantidade de água penetrada a 25 °C previamente purificada com membrana de osmose reversa, preferencialmente não é de menos de $2 \times 10^{-9} \text{ m}^3/\text{m}^2/\text{s}/\text{Pa}$. Quando o coeficiente de permeabilidade a água purificada encontrar-se na faixa de $2 \times 10^{-9} \text{ m}^3/\text{m}^2/\text{s}/\text{Pa}$ ou mais a $6 \times 10^{-7} \text{ m}^3/\text{m}^2/\text{s}/\text{Pa}$ ou menos, pode-se atingir quantidade praticamente suficiente de água penetrada.

Na membrana porosa utilizada na presente invenção, a aspereza da superfície é a altura média em direção perpendicular à superfície. A aspereza de superfície da membrana é um dos fatores pelos quais os microorganismos ou células cultivadas que se aderem à superfície da membrana de separação tornam-se facilmente removíveis por efeito de lavagem de superfície da membrana resultante de fluxo de líquido sob agitação ou com bomba de circulação. A aspereza de superfície da membrana porosa é preferencialmente de $0,1 \text{ }\mu\text{m}$ ou menos. Quando a aspereza da superfície for de $0,1 \text{ }\mu\text{m}$ ou menos, microorganismos ou células cultivadas que se aderem à membrana são facilmente removíveis.

Descobriu-se que membrana porosa que possui aspereza de superfície de $0,1 \text{ }\mu\text{m}$ ou menos, tamanho médio de poro de $0,01 \text{ }\mu\text{m}$ ou mais a menos de $1 \text{ }\mu\text{m}$ e coeficiente de permeabilidade a água purificada de não menos de $2 \times 10^{-9} \text{ m}^3/\text{m}^2/\text{s}/\text{Pa}$ pode ser utilizada de maior preferência para conduzir a operação mais facilmente sem a necessidade de potência excessiva necessária para lavagem da superfície da membrana. Quando a aspereza de superfície da membrana porosa for de $0,1 \text{ }\mu\text{m}$ ou menos, a resistência de corte gerada sobre a superfície da membrana mediante filtragem de

microorganismos ou células cultivadas pode ser reduzida e, desta forma, pode-se evitar que os microorganismos sejam rompidos e pode-se também evitar que a membrana porosa seja obstruída, de forma a permitir filtragem estável mais facilmente por longo período. A aspereza de superfície da membrana porosa é preferencialmente de 0,1 μm ou menos, de forma que a membrana permita fermentação contínua com diferença de pressão transmembrana mais baixa e, mesmo mediante obstrução, é de excelente recuperação por meio de lavagem em comparação com o caso de operação com alta diferença de pressão transmembrana. Como a fermentação contínua estável é tornada viável ao evitar-se obstruções, a aspereza de superfície da membrana porosa é preferencialmente mais baixa.

A aspereza de superfície da membrana foi medida com o microscópio de força atômica (AFM) a seguir sob as seguintes condições:

UNIDADE:

Microscópio de força atômica (Nanoscope IIIa fabricado pela Digital Instruments)

CONDIÇÕES

Sonda: braço SiN (fabricado pela Digital Instruments)

Modo de varrimento: modo de contato (medição em ar)

Modo de derivação subaquática (medição em água)

Faixa de varrimento: 10 μm , 25 μm sobre um lado (medição em ar)

5 μm , 10 μm sobre um lado (medição em ar)

Resolução de varrimento: 512 x 512

Preparação de amostra: Amostra de membrana foi mergulhada em etanol sob temperaturas comuns por quinze minutos, mergulhada em seguida em água RO por 24 horas, lavada e seca em ar antes da medição.

A partir da altura na direção do eixo Z em cada ponto, foi

calculada rigidez de superfície da membrana d_{rough} com com o microscópio de força atômica (AFM) utilizando a equação a seguir (2):

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

d_{rough} : rigidez média da superfície

Z_n : altura no eixo Z

5 $\bar{Z}$: altura média na faixa de varrimento

A membrana porosa utilizada na presente invenção é preferencialmente membrana de folha plana. Quando a membrana porosa for membrana de folha plana, sua espessura média é selecionada dependendo do uso pretendido. Quando a membrana porosa for membrana de folha plana, a sua espessura média é preferencialmente de 20 ou mais a 5000 μm ou menos, de maior preferência 50 ou mais a 2000 μm ou menos.

A membrana porosa utilizada na presente invenção é preferencialmente membrana de fibra oca. Quando a membrana porosa for membrana de fibra oca, o diâmetro interno da fibra oca é preferencialmente de 15 200 a 5000 μm e a espessura da membrana é preferencialmente de 20 a 2000 μm . Tecido ou material têxtil fabricado com fibras orgânicas ou inorgânicas cilíndricas pode estar contido no lado interno da fibra oca.

Método de formação da membrana porosa utilizada na presente invenção é descrito por meio de referência a linhas gerais do método.

20 Será agora descrito resumidamente o método de formação de membrana de folha plana da membrana porosa.

Revestimento de solução padrão que contém resina e solvente é formado sobre a superfície de material base poroso e, simultaneamente, o material base poroso é impregnado com a solução padrão. Em seguida, 25 somente a superfície, ao lado do revestimento, do material base poroso é

colocada em contato com banho de coagulação que contém não solvente, de forma a coagular a resina e, simultaneamente, formar camada de resina porosa sobre a superfície do material base poroso.

A solução padrão é preparada na forma de dissolução de resina em solvente. Do ponto de vista de propriedade de fabricação de membrana, normalmente é preferível que a temperatura da solução padrão seja selecionada na faixa de 5 a 120 °C. O solvente dissolve resina e age sobre a resina para promover a formação de camada de resina porosa da resina. O solvente que pode ser utilizado no presente inclui N-metilpirrolidinona (NMP), N,N-dimetilacetamida (DMAc), N,N-dimetilformamida (DMF), sulfóxido de dimetila (DMSO), N-metil-2-pirrolidona, metil etil cetona, tetraidrofurano, tetrametil uréia, fosfato de trimetila, ciclohexanona, isoforona, γ -butirolactona, metil isoamil cetona, ftalato de dimetila, propileno glicol metil éter, carbonato de propileno, álcool diacetona, triacetato de glicerol, acetona e metil etil cetona. Dentre estes solventes, podem ser preferencialmente utilizados N-metilpirrolidinona (NMP), N,N-dimetilacetamida (DMAc), N,N-dimetilformamida (DMF) e sulfóxido de dimetila (DMSO), que podem apresentar alta dissolução da resina. Estes solventes podem ser utilizados isoladamente ou na forma de mistura de dois ou mais destes.

Componentes diferentes do solvente, tais como polietileno glicol, álcool polivinílico, polivinil pirrolidona e glicerina, podem ser adicionados ao solvente. Não solvente pode também ser adicionado ao solvente. O não solvente é líquido que não dissolve a resina. O não solvente age como regulador do tamanho dos poros por meio de regulação da velocidade de coagulação da resina. Como não solvente, podem ser utilizados água e álcoois tais como metanol e etanol. Particularmente, o não solvente é preferencialmente água ou metanol, do ponto de vista do preço. O componente diferente de solvente e o não solvente podem também ser mistura.

Agente formador de poros pode também ser adicionado à solução padrão. O agente formador de poros possui papel tal que, mediante imersão em banho de coagulação, é extraído de camada de resina para tornar porosa a camada de resina. Por meio de adição do agente formador de poros, pode-se

5 regular o tamanho médio de poro da membrana porosa. Preferencialmente, o agente formador de poros é altamente solúvel no banho de coagulação. Exemplos dos agentes formadores de poros utilizáveis incluem sais inorgânicos, tais como cloreto de cálcio e carbonato de cálcio. Alternativamente, como agentes formadores de poros, podem ser utilizados

10 polioxialquilenos, tais como polietileno glicol e polipropileno glicol; polímeros hidrossolúveis, tais como álcool polivinílico, polivinil butiral e ácidos poliacrílicos; e glicerina.

Será agora descrito resumidamente o método de formação de membrana de folha oca como a membrana porosa.

15 A membrana de fibra oca pode ser preparada por meio de descarga de solução padrão elaborada com resina e solvente por meio de cano externo de base de cano duplo, descarregando simultaneamente fluido de formação de espaços ocos por meio de cano interno da base de cano duplo, solidificando-os por meio de resfriamento em banho de resfriamento.

20 A solução padrão pode ser preparada por meio de dissolução da resina descrita acima no método de preparação de membrana de folha plana, em concentração de 20% ou mais a 60% ou menos em peso, no solvente descrito acima no método de preparação de membrana de folha plana. O fluido de formação de espaços ocos pode ser normalmente gás ou líquido. A

25 superfície externa da membrana de fibra oca resultante pode também ser revestida (laminada) com nova camada de resina porosa. Laminação pode ser conduzida para alterar as propriedades (tais como hidrofiliabilidade/hidrofobicidade, tamanho de poro etc.) da membrana de fibra

oca para propriedades desejadas. A nova camada de resina porosa a ser laminada sobre ela pode ser preparada colocando-se a solução padrão que possui resina dissolvida em solvente em contato com banho de coagulação que não contém solvente para coagular a resina. Como material da resina, o mesmo material da membrana de polímero orgânico, por exemplo, pode ser preferencialmente utilizado. O método de laminação não é particularmente limitado e a membrana de fibra oca pode ser imersa na solução padrão ou pode ser revestida sobre ela com a solução padrão e, após a laminação, parte da solução padrão de adesão pode ser raspada ou soprada com faca de ar para regular a quantidade do laminado.

A membrana porosa utilizada na presente invenção pode ser formada em elemento de membrana de separação por meio de união/vedação de espaço oco da membrana de fibra oca com membro tal como resina e, em seguida, colocação da membrana sobre suporte.

A membrana porosa utilizada na presente invenção pode ser combinada com suporte para formar elemento de membrana de separação. O elemento de membrana de separação que possui placa de sustentação como suporte no qual a membrana porosa utilizada na presente invenção é disposta sobre pelo menos um lado da placa de sustentação é um modo preferível do elemento de membrana de separação que contém a membrana porosa utilizada na presente invenção. Elemento de membrana de separação que contém a membrana porosa sobre os dois lados de placa de sustentação para aumentar a quantidade de água em penetração também é modo preferível do elemento de membrana de separação.

O método de fabricação de produto químico de acordo com a presente invenção inclui filtragem com diferença de pressão transmembrana na faixa de 0,1 a 20 kPa. Quando cultivo de fermentação for filtrado com diferença de pressão transmembrana de mais de 20 kPa, é necessário energia elétrica

para aplicar pressão, o que reduz a eficácia econômica de fabricação de produto químico. Dada a diferença de pressão transmembrana de mais de 20 kPa, microorganismo ou células cultivadas podem ser rompidas para reduzir a capacidade de fabricação de produto químico. No método de fabricação de produto químico de acordo com a presente invenção, diferença de pressão transmembrana, ou seja, pressão de filtração encontra-se na faixa de 0,1 a 20 kPa, que pode ser atingida por diferença de cabeça d'água e, desta forma, não é necessário que o lado interno do fermentador seja particularmente mantido sob pressão, de forma que a capacidade de fabricação de produto químico não seja reduzida. Como não é necessário que o lado interno do fermentador seja particularmente mantido sob pressão, a membrana porosa pode ser disposta no interior do fermentador, o que pode resultar em outra desvantagem do pequeno dimensionamento do aparelho de fermentação. O método de fabricação de produto químico de acordo com a presente invenção inclui filtração com diferença de pressão transmembrana preferencialmente na faixa de 0,1 a 2 kPa.

No método de fabricação de produto químico de acordo com a presente invenção, são utilizados materiais de fermentação. Os materiais de fermentação utilizados na presente invenção podem ser quaisquer materiais que promovam o crescimento de microorganismo de cultivo para permitir que o microorganismo gere satisfatoriamente produto de fermentação objetivo como produto químico.

Os materiais de fermentação utilizados na presente invenção encontram-se preferencialmente na forma de meio líquido comum que contém fonte de carbono, fonte de nitrogênio e sais inorgânicos e que contém adequadamente micronutrientes orgânicos tais como aminoácidos e vitaminas, conforme o necessário. A fonte de carbono que pode ser utilizada no presente inclui açúcares tais como glicose, sacarose, frutose, galactose e lactose,

açúcares de amido que contêm esses açúcares, melaços de batata doce, melaços de beterraba de açúcar e melaços de alto teste, ácidos orgânicos tais como ácido acético, álcoois tais como etanol e glicerina. A fonte de nitrogênio que pode ser utilizada no presente inclui gás amônia, água de amônia, sais de amônio, uréia, nitratos e outras fontes de nitrogênio orgânicas utilizadas secundariamente, tais como aglomerados de óleo, hidrolisados de soja, digeridos de caseína, outros aminoácidos, vitaminas líquido de fermentação de milho, leveduras ou extrato de levedura, extrato de carne, pepídeos tais como peptona e vários microorganismos de fermentação e seus hidrolisados. Os sais inorgânicos que podem ser adequadamente adicionados incluem fosfatos, sais de magnésio, sais de cálcio, sais de ferro e sais de manganês.

Quando os microorganismos utilizados na presente invenção necessitarem de nutriente específico para o seu crescimento, o nutriente é adicionado na forma de preparação ou de produto natural que o contém. Agente antiespumante é utilizado, se necessário. O cultivo de acordo com a presente invenção designa líquido obtido como resultado do crescimento de microorganismo ou células cultivadas com os materiais de fermentação. A composição de materiais de fermentação a ser adicionada pode ser adequadamente alterada da composição dos materiais de fermentação utilizados no início do cultivo.

Na presente invenção, a concentração de açúcares no cultivo é mantida preferencialmente em 5 g/l ou menos. A razão pela qual a concentração de açúcares no cultivo é mantida preferencialmente em 5 g/l ou menos é que o fluxo de saída de açúcares mediante retirada do cultivo pode ser minimizado àquela concentração.

O microorganismo é cultivado normalmente sob pH 4 a 8 sob temperatura na faixa de 20 a 40 °C. O pH do cultivo é ajustado em valor previamente determinado, normalmente na faixa de pH 4 a 8 com ácido

orgânico ou inorgânico, substância alcalina, uréia, carbonato de cálcio, gás amônia ou similares. Quando for necessário aumentar a velocidade de fornecimento de oxigênio, é possível empregar meios de adição de oxigênio a ar para manter concentração de oxigênio de não menos de 21% ou meios de
5 pressurização do cultivo, aumento da velocidade de agitação ou aumento da aeração.

No método de fabricação de produto químico de acordo com a presente invenção, cultivo de bateladas ou cultivo de bateladas alimentadas pode ser conduzido em estágio inicial de cultivo para aumentar a densidade de
10 microorganismos, seguido por cultivo contínuo (retirada). No método de fabricação de produto químico de acordo com a presente invenção, a densidade de microorganismos pode aumentar, seguida por semeadura de alta densidade de microorganismos, de forma a iniciar o cultivo e conduzir simultaneamente cultivo contínuo. No método de fabricação de produto químico
15 de acordo com a presente invenção, o fornecimento do cultivo inicial e a retirada do cultivo podem ser iniciados em etapa apropriada. O momento de início do fornecimento do cultivo inicial e o momento de início da retirada do cultivo podem nem sempre ser o mesmo. O fornecimento do cultivo inicial e a retirada do cultivo podem ser conduzidos contínua ou intermitentemente.

20 Os nutrientes necessários para o crescimento do microorganismo podem ser adicionados ao cultivo inicial, de forma que o microorganismo cresça continuamente. Para atingir produtividade eficiente, a densidade de microorganismos ou células cultivadas no cultivo é preferencialmente mantida alta em faixa em que o ambiente do cultivo não se torna inadequado para o
25 crescimento dos microorganismos ou células cultivadas para causar alta taxa de mortalidade. Os microorganismos ou células cultivadas no cultivo mantido em densidade de não menos de 5 g/l em peso seco, por exemplo, possibilitaram excelente eficiência de produção.

No método de fabricação de produto químico de acordo com a presente invenção, os microorganismos ou células cultivadas podem ser retirados conforme o necessário do fermentador. Como a membrana de separação é facilmente obstruída, por exemplo, quando a densidade dos microorganismos ou células cultivadas no fermentador tornar-se alta demais, essa obstrução pode ser evitada por meio de retirada. O desempenho de fabricação de produto químico pode variar dependendo da densidade dos microorganismos ou células cultivadas no fermentador e o desempenho produtivo pode ser mantido por meio de retirada dos microorganismos ou células cultivadas com o desempenho produtivo como indicador.

No método de fabricação de produto químico de acordo com a presente invenção, o número de fermentadores não é limitado, desde que a operação de cultivo contínuo durante a qual microorganismos novos capazes de produção por fermentação são cultivados seja conduzida por meio de método de cultivo contínuo em que os microorganismos são cultivados e, simultaneamente, é formado produto. No método de fabricação de produto químico de acordo com a presente invenção, é preferível para controle de cultivo que a operação de cultivo contínuo seja normalmente conduzida em um único fermentador. Uma série de fermentadores pode ser utilizado, entretanto, por motivos tais como pequena capacidade do fermentador. Neste caso, uma série de fermentadores pode ser conectada em paralelo ou em série, em fermentação contínua para atingir alta produtividade do produto de fermentação.

São agora descritos os microorganismos ou células cultivadas que podem ser utilizados no método de fabricação de produto químico de acordo com a presente invenção. Os microorganismos ou células cultivadas que podem ser utilizados no método de fabricação de produto químico de acordo com a presente invenção não são limitados. Os microorganismos ou

células cultivadas utilizados na presente invenção incluem, por exemplo, leveduras tais como levedura de padaria (*Saccharomyces cerevisiae*) utilizada freqüentemente em indústria de fermentação, bactérias tais como *Escherichia coli* ou bactérias corineformes, bactérias filamentosas, micobactérias, células
5 de animais e células de insetos. Os microorganismos ou células utilizados podem ser isolados do ambiente natural ou podem ser aqueles que possuem propriedades modificadas parcialmente por meio de mutação ou recombinação genética.

O produto químico fabricado por meio do método de fabricação de
10 produto químico de acordo com a presente invenção não é limitado, desde que seja substância produzida em cultivo pelos microorganismos ou células descritos acima. O produto químico fabricado por meio do método de fabricação de produtos químicos de acordo com a presente invenção inclui substâncias tais como álcoois, ácidos orgânicos, aminoácidos e ácidos
15 nucleicos que são produzidos em grandes quantidades na indústria de fermentação. Exemplos desses produtos químicos incluem álcoois tais como etanol, 1,3-propanodiol, 1,4-butanodiol e glicerol, ácidos orgânicos tais como ácido acético, ácido láctico, ácido pirúvico, ácido succínico, ácido málico, ácido itacônico e ácido cítrico, ácidos nucleicos tais como nucleosídeos como inosina
20 e guanosina e nucleotídeos tais como ácido inosínico e ácido guanílico, bem como compostos de diamina tais como cadaverina. A presente invenção pode também ser aplicada à produção de substâncias tais como enzimas, antibióticos e proteínas recombinantes.

São agora descritos os microorganismos ou células cultivadas
25 que podem ser utilizados no método de fabricação de produto químico de acordo com a presente invenção por meio de referência a produtos químicos específicos.

No método de fabricação de produto químico de acordo com a

presente invenção, os microorganismos ou células cultivadas que podem ser utilizados na fabricação de ácido L-láctico não são particularmente limitados, desde que sejam microorganismos capazes de produzir ácido L-láctico. No método de fabricação de produto químico de acordo com a presente invenção,

5 os microorganismos ou células cultivadas que podem ser utilizados na fabricação de ácido L-láctico são preferencialmente bactérias de ácido láctico. As bactérias de ácido láctico da forma utilizada no presente podem ser definidas como microorganismos procarióticos que produzem 50% ou mais de ácido láctico na forma de rendimento em açúcar (glicose consumida).

10 Exemplos preferíveis de bactérias de ácido láctico incluem bactérias de ácido láctico pertencentes ao gênero *Lactobacillus*, gênero *Pediococcus*, gênero *Tetragenococcus*, gênero *Carnobacterium*, gênero *Vagococcus*, gênero *Leuconostoc*, gênero *Oenococcus*, gênero *Atopobium*, gênero *Streptococcus*, gênero *Enterococcus*, gênero *Lactococcus* e gênero *Bacillus*. Dentre eles, a

15 bactéria de ácido láctico que possui alto rendimento de ácido láctico em açúcar pode ser selecionada e utilizada preferencialmente na produção de ácido láctico. No método de fabricação de produto químico de acordo com a presente invenção, bactérias de ácidos lácticos que possuem alto rendimento de ácido láctico, particularmente ácido L-láctico, em açúcar podem ser selecionadas e

20 utilizadas preferencialmente na produção de ácido láctico. Ácido L-láctico é um tipo de isômeros óticos de ácido láctico e pode ser claramente diferenciado do seu enantiômero ácido D-láctico. Exemplos de bactérias de ácido láctico que possuem alto rendimento de ácido L-láctico em açúcar incluem *Lactobacillus yamanashiensis*, *Lactobacillus animalis*, *Lactobacillus agilis*, *Lactobacillus aviaries*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbruekii*, *Lactobacillus paracasei*,

25 *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus ruminis*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus sharpeae*, *Pediococcus dextrinicus* e *Lactococcus lactis*, e estes podem ser selecionados para produzir ácido L-láctico.

Quanto ácido L-láctico for produzido por meio do método de fabricação de produto químico de acordo com a presente invenção, pode-se utilizar os microorganismos ou células cultivadas que foram dotadas artificialmente com a capacidade de produção de ácido láctico, ou que se permitiu ampliarem esta produção. Os microorganismos ou células cultivadas nos quais foi introduzido gene L-lactato desidrogenase (às vezes indicado a seguir como L-LDH) para proporcionar ou aumentar a capacidade de produção de ácido L-láctico, por exemplo, podem ser utilizados. O método de fornecimento ou aumento da capacidade de produção de ácido L-láctico pode também ser método de mutagênese química conhecido na técnica. O microorganismo é preferencialmente microorganismo recombinante cuja capacidade de produção de ácido L-láctico foi aumentada pela integração de L-LDH. Quando ácido L-láctico for produzido por meio do método de fabricação de produto químico de acordo com a presente invenção, um hospedeiro do microorganismo recombinante é preferencialmente *Escherichia coli* ou bactéria de ácido láctico que é célula procariótica ou levedura que é célula eucariótica, de preferência específica levedura. A levedura é preferencialmente levedura que pertence ao gênero *Saccharomyces*, de maior preferência *Saccharomyces cerevisiae*.

O L-LDH utilizado na presente invenção não é limitado, desde que codifique proteína que possui atividade de conversão de dinucleotídeo nicotinamida adenina reduzido (NADH) e ácido pirúvico em dinucleotídeo nicotinamida adenina (NAD⁺) oxidado e ácido L-láctico. Pode-se utilizar, por exemplo, L-LDH derivado de bactérias de ácido láctico que possuem alto rendimento de ácido L-láctico em açúcar. Preferencialmente, pode-se utilizar L-LDH derivado de mamífero. Pode-se particularmente utilizar L-LDH derivado de *Homo sapiens* ou de sapo. O L-LDH derivado de sapo que pode ser utilizado na presente invenção é, de preferência específica, L-LDH derivado de sapo

pertencente a *Pipidae*, de maior preferência L-LDH derivado de *Xenopus laevis* que é sapo pertencente a *Pipidae*.

O L-LDH derivado de sapo ou de seres humanos utilizado na presente invenção inclui genes do tipo mutante resultantes de polimorfismo genético, mutagênese ou similares. Polimorfismo genético designa alteração
5 parcial em seqüência de nucleotídeos de gene por meio de mutação espontânea sobre o gene. Mutagênese designa introdução artificial de mutação em gene. Pode-se atingir mutagênese, por exemplo, por meio de método de uso de kit para mutagênese dirigida a local (Mutan-K fabricado pela Takara Bio)
10 ou método de uso de kit para mutagênese aleatória (Mutagênese Aleatória PCR BD Diversify fabricado pela CLONTECH). O L-LDH derivado de seres humanos ou sapos utilizado na presente invenção pode possuir exclusão ou inserção em parte da sua seqüência de nucleotídeos, desde que codifique proteína que possua atividade de conversão de NADH e ácido pirúvico em
15 NAD^+ e ácido L-láctico.

Quando ácido L-láctico for produzido por meio do método de fabricação de produto químico de acordo com a presente invenção, a separação e a purificação de ácido L-láctico contido no líquido de fermentação filtrado/separado produzido podem ser conduzidas por meio de combinação de
20 métodos convencionalmente conhecidos, tais como concentração, destilação e cristalização. Seus exemplos incluem um método que envolve a redução do pH do líquido de fermentação filtrado/separado para 1 ou menos e, em seguida, extração de ácido L-láctico com dietil éter, acetato de etila ou similar, método que envolve a adsorção do líquido de fermentação para resina de troca de
25 íons, lavagem da resina e eluição de ácido L-láctico, método que envolve a reação de ácido L-láctico no líquido de fermentação com álcool na presença de catalisador ácido para convertê-lo no éster correspondente seguido pela sua destilação e método que envolve a cristalização de ácido L-láctico como sal de

cálcio ou sal de lítio. Preferencialmente, solução de ácido L-láctico concentrada obtida por meio da evaporação de água do líquido de fermentação filtrado/separado pode ser submetida a destilação. Durante a destilação, a solução original a ser destilada é submetida a destilação, preferencialmente
5 durante a alimentação de água, de forma que a concentração de água da solução seja mantida constante. Solução aquosa de ácido L-láctico obtida por meio de destilação pode ser concentrada por meio de evaporação de água sob aquecimento para gerar concentração objeto de ácido L-láctico purificado. Quando solução aquosa de ácido L-láctico que contém componentes com
10 baixo ponto de ebulição tais como etanol e ácido acético for obtida na forma de destilado, os componentes com baixo ponto de ebulição são preferencialmente removidos em etapa de concentração de ácido L-láctico. Após a operação de destilação, o destilado pode também ser purificado com resina de troca de íons ou carvão ativado, por meio de separação cromatográfica ou similar conforme o
15 necessário para remover impurezas, para gerar ácido L-láctico com pureza mais alta.

Quando ácido D-láctico for produzido por meio do método de fabricação de produto químico de acordo com a presente invenção, os microorganismos ou células cultivadas que podem ser utilizados na fabricação
20 de ácido D-láctico não são limitados, desde que possam produzir ácido D-láctico. Os microorganismos ou células cultivadas que podem ser utilizados em produção de ácido D-láctico incluem, por exemplo, microorganismos pertencentes à linhagem de tipo selvagem dos gêneros *Lactobacillus*, *Bacillus* e *Pediococcus* que possuem capacidade de sintetizar ácido D-láctico.

25 Quando ácido D-láctico for produzido por meio do método de fabricação de produto químico de acordo com a presente invenção, os microorganismos ou células cultivadas utilizados são preferencialmente aqueles em que a atividade enzimática de D-lactato desidrogenase (às vezes

denominada a seguir D-LDH) da linhagem do tipo selvagem foi aumentada. O método de aumento da atividade enzimática pode também ser método de mutagênese química conhecido na técnica. De maior preferência, o microorganismo é microorganismo recombinante no qual a atividade enzimática de D-lactato desidrogenase foi aumentada por meio de integração de gene que codifica D-lactato desidrogenase. Quando ácido D-láctico for produzido por meio do método de fabricação de produto químico de acordo com a presente invenção, um hospedeiro do microorganismo recombinante é preferencialmente *Escherichia coli* ou bactéria de ácido láctico que é célula procariótica ou levedura que é célula eucariótica, de preferência específica levedura.

Quando ácido D-láctico for produzido por meio do método de fabricação de produto químico de acordo com a presente invenção, o gene que codifica D-lactato desidrogenase é preferencialmente gene derivado de *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus acidilactici* ou *Bacillus laevolacticus*, de maior preferência gene derivado de *Bacillus laevolacticus*.

Quando ácido D-láctico for produzido por meio do método de fabricação de produto químico de acordo com a presente invenção, a separação e a purificação de ácido D-láctico contido no líquido de fermentação filtrado/separado produzido podem ser conduzidas por meio de combinação de métodos convencionalmente conhecidos, tais como concentração, destilação e cristalização. Seus exemplos incluem um método que envolve a redução do pH do líquido de fermentação filtrado/separado para 1 ou menos e, em seguida, extração de ácido D-láctico com dietil éter, acetato de etila ou similar, método que envolve a adsorção do líquido de fermentação para resina de troca de íons, lavagem da resina e eluição de ácido D-láctico, método que envolve a reação de ácido -láctico no líquido de fermentação com álcool na presença de catalisador ácido para convertê-lo no éster correspondente seguido pela sua destilação e método que envolve a cristalização de ácido D-láctico como sal de

cálcio ou sal de lítio. Preferencialmente, solução de ácido D-láctico concentrada obtida por meio da evaporação de água do líquido de fermentação filtrado/separado pode ser submetida a destilação quando ácido D-láctico for produzido por meio do método de fabricação de produto químico de acordo com a presente invenção. Durante a destilação, a solução original a ser destilada é submetida a destilação, preferencialmente durante a alimentação de água, de forma que a concentração de água da solução seja mantida constante. Solução aquosa de ácido D-láctico obtida por meio de destilação pode ser concentrada por meio de evaporação de água sob aquecimento para gerar concentração objeto de ácido D-láctico purificado. Quando solução aquosa de ácido D-láctico que contém componentes com baixo ponto de ebulição (etanol, ácido acético etc.) for obtida na forma de destilado, os componentes com baixo ponto de ebulição são preferencialmente removidos em etapa de concentração de ácido D-láctico. Após a operação de destilação, o destilado pode também ser purificado com resina de troca de íons ou carvão ativado, por meio de separação cromatográfica ou similar conforme o necessário para remover impurezas, para gerar ácido D-láctico com pureza mais alta.

Quando etanol for produzido por meio do método de fabricação de produto químico de acordo com a presente invenção, os microorganismos ou células cultivadas que podem ser utilizados na fabricação de etanol não são limitados, desde que sejam microorganismos ou células cultivadas que possam produzir ácido pirúvico. Os microorganismos ou células cultivadas que podem ser utilizados na produção de etanol incluem, por exemplo, microorganismos pertencentes ao gênero *Saccharomyces*, gênero *Kluyveromyces* e gênero *Schizosaccharomyces*. Dentre estes, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis* e *Schizosaccharomyces pombe* podem ser preferencialmente utilizados. Microorganismos pertencentes ao gênero

Lactobacillus e ao gênero *Zymomonas* podem também ser preferencialmente utilizados. Dentre eles, *Lactobacillus brevis* e *Zymomonas mobilis* podem ser preferencialmente utilizados.

Os microorganismos ou células cultivadas que podem ser utilizados na produção de etanol na presente invenção podem ser microorganismos ou células cultivadas que possuem capacidade aumentada artificialmente de produção de etanol. Especificamente, os microorganismos ou células cultivadas que podem ser utilizados na produção de etanol na presente invenção podem ser os que possuem propriedades modificadas parcialmente por meio de mutação ou recombinação genética. Exemplos dos microorganismos ou células cultivadas que possuem propriedades parcialmente modificadas incluem leveduras dotadas de capacidade de assimilação de amido bruto por meio de integração de gene glicoamilase derivado de fungo pertencente ao gênero *Rhizopus* (*Biseibutsu* (*Microorganism*), 3: 555-564 (1987)). Método de purificação utilizando destilação ou método de concentração/purificação que utiliza NF, membrana de RO ou membrana de separação de zeólitos pode ser preferencialmente utilizado na separação e purificação de etanol contido no líquido de fermentação filtrado/separado elaborado por meio do método de produção de acordo com a presente invenção.

Quando ácido pirúvico for produzido por meio do método de fabricação de produto químico de acordo com a presente invenção, os microorganismos ou células cultivadas que podem ser utilizados na fabricação de ácido pirúvico não são limitados, desde que sejam microorganismos ou células cultivadas que possam produzir ácido pirúvico. Os microorganismos ou células cultivadas que podem ser preferencialmente utilizados na produção de ácido pirúvico incluem, por exemplo, microorganismos pertencentes ao gênero *Pseudomonas*, gênero *Corynebacterium*, gênero *Escherichia* e gênero

Acinetobacter. De maior preferência, podem ser utilizados microorganismos tais como *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*. Podem também ser utilizados microorganismos recombinantes criados submetendo-se estes microorganismos a mutação ou recombinação genética para modificar parcialmente as suas propriedades. São também preferencialmente utilizados, por exemplo, os microorganismos em que o gene ATPase envolvido diretamente na produção de ATP por meio de fosforilação oxidativa sofreu mutação ou foi excluído. Fungos e leveduras podem também ser preferencialmente utilizados. Podem ser utilizados fungos e leveduras pertencentes ao gênero *Saccharomyces*, gênero *Toluloposis*, gênero *Candida* e gênero *Schizophyllum*. De maior preferência, fungos e leveduras tais como *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces copsis*, *Candida glabrata*, *Candida lipolytica*, *Toluloposis glabrata* e *Schizophyllum commune* podem ser utilizados para produzir ácido pirúvico.

Quando ácido pirúvico for produzido por meio do método de fabricação de produto químico de acordo com a presente invenção, a separação e a purificação de ácido pirúvico contido no líquido de fermentação filtrado/separado podem ser conduzidas por meio de método que utiliza coluna de troca de ânions. Pode ser preferencialmente utilizado, por exemplo, método de purificação que utiliza trocador de íons fracamente halofíticos exibido em JP-A nº 6-345683.

Quando ácido succínico for produzido por meio do método de fabricação de produto químico de acordo com a presente invenção, os microorganismos ou células cultivadas que podem ser utilizados na fabricação de ácido succínico não são limitados, desde que sejam microorganismos ou células cultivadas que possam produzir ácido succínico. Os microorganismos ou células cultivadas que podem ser preferencialmente utilizados na produção de ácido succínico incluem, por exemplo, microorganismos pertencentes aos

gêneros *Anaerobiospirillum* e *Actinobacillus*. Exemplos específicos desses microorganismos incluem *Anaerobiospirillum succiniciproducens*, descrito na Patente Norte-Americana nº 5.143.833, e *Actinobacillus succinogenes*, descrito por James B. Mckinlay et al (*Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 71, 6651-6656 (2005).

- 5 Podem também ser utilizadas bactérias corineformes dos gêneros *Corynebacterium* e *Brevibacterium* e *Escherichia*. Bactérias corineformes são preferencialmente *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium flavum* e *Brevibacterium lactofermentum*.

- Os microorganismos podem ser aqueles que possuem
10 capacidade de produção de ácido succínico aprimorada por meio de recombinação genética, por meio do quê a produtividade de ácido succínico pode ser aprimorada. Exemplos dos microorganismos que podem ser utilizados no presente incluem *Brevibacterium flavum* MJ233AB-41 com deficiência de lactato desidrogenase (FERM BP-1498) descrito em JP-A nº 2005-27533,
15 *Corynebacterium glutamicum* descrito no Documento Não de Patente 1, e linhagens de *Escherichia coli* AFP111 com deficiência de liase e lactato desidrogenase descritas na Patente Norte-Americana nº 5.770.435.

- Quando ácido succínico for produzido por meio do método de fabricação de produto químico de acordo com a presente invenção, método
20 habitual de purificação de ácido succínico pode ser aplicado para separação e purificação de ácido succínico. Pode ser preferencialmente utilizado método de purificação de combinação de tratamento de hidrólise eletrodialise e cristalização/concentração a vácuo exibido em JP-A- nº 2005-333886.

- Quando ácido itacônico for produzido por meio do método de
25 fabricação de produto químico de acordo com a presente invenção, os microorganismos ou células cultivadas que podem ser utilizados na fabricação de ácido itacônico não são limitados, desde que sejam microorganismos ou células cultivadas que possam produzir ácido itacônico. Os microorganismos

ou células cultivadas que podem ser preferencialmente utilizados na produção de ácido itacônico incluem fungos e leveduras. De maior preferência, fungos pertencentes ao gênero *Aspergillus* ou gênero *Ustilago*, ou leveduras pertencentes ao gênero *Candida* ou gênero *Rhodotorula*, são utilizados na produção de ácido itacônico. Podem ser particularmente utilizados fungos tais como *Aspergillus terreus*, *Aspergillus itaconicus*, *Ustilago maydis*, *Ustilago cynodontis* e *Ustilago rabenhorstina*, ou *Candia antarctica*, na produção de ácido itacônico.

Quando ácido itacônico for produzido por meio do método de fabricação de produto químico de acordo com a presente invenção, a separação e a purificação de ácido itacônico podem ser conduzidas utilizando ultrafiltração e eletrodialise. Pode ser preferencialmente utilizado, por exemplo, método de purificação por meio de ultrafiltração e eletrodialise com membrana de resina de troca de cátions do tipo sal exibida na Patente Japonesa nº 50958.

Quando 1,3-propanodiol for produzido por meio do método de fabricação de produto químico de acordo com a presente invenção, os microorganismos ou células cultivadas que podem ser utilizados na fabricação de 1,3-propanodiol não são limitados, desde que sejam microorganismos ou células cultivadas que possam produzir 1,3-propanodiol. Os microorganismos ou células cultivadas que podem ser preferencialmente utilizados na produção de 1,3-propanodiol incluem, por exemplo, linhagens do tipo selvagem tais como microorganismos pertencentes aos gêneros *Klebsiella*, *Clostridium* e *Lactobacillus* que possuem capacidade de produção de 1,3-propanodiol a partir de glicerol.

Quando 1,3-propanodiol for produzido por meio do método de produção de produto químico de acordo com a presente invenção, o microorganismo contém preferencialmente (a) pelo menos um gene que codifica polipeptídeo que possui atividade de glicerol desidratase; (b) pelo

menos um gene que codifica fator de reativação de glicerol desidratase; e (c) pelo menos um gene que codifica atividade catalisadora não específica de conversão de 3-hidroxi-propanalaldeído em 1,3-propanodiol. Na presente invenção, o microorganismo é, de preferência específica, microorganismo recombina-
5 recombina-nte que permite a produção de 1,3-propanodiol.

Quando 1,3-propanodiol for produzido por meio do processo de fabricação de produto químico de acordo com a presente invenção, o microorganismo que possui capacidade de produzir 1,3-propanodiol a partir de glicerol é preferencialmente microorganismo recombina-nte selecionado a partir
10 do grupo que consiste de *Klebsiella*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Cyrobacter*, *Enterobacter*, *Aerobacter*, *Aspergillus*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Pichia*, *Kluyveromyces*, *Candida*, *Hansenula*, *Debaryomyces*, *Mucor*, *Torulopsis*, *Methylobacter*, *Salmonella*, *Bacillus*, *Aerobacter*, *Streptomyces*, *Eschericia* e *Pseudomonas*, e é de maior
15 preferência *Escherichia coli*.

Quando 1,3-propanodiol for produzido por meio do método de fabricação de produto químico de acordo com a presente invenção, o microorganismo recombina-nte é preferencialmente modificado para permitir a produção de 1,3-propanodiol eficientemente a partir de glicose. O
20 microorganismo recombina-nte é preferencialmente microorganismo recombina-nte que contém (a) pelo menos um gene que codifica polipeptídeo que possui atividade de glicerol-3-fosfato desidratase; e (b) pelo menos um gene que codifica polipeptídeo que possui atividade de glicerol-3-fosfatase e é, de maior preferência, microorganismo recombina-nte que contém gene no qual
25 fator de reativação de glicerol desidratase é codificado por orfX e orfZ isolado a partir de regulador dha. O microorganismo recombina-nte é, de preferência ainda maior, microorganismo recombina-nte com deficiência na atividade de glicerol quinase e/ou atividade de glicerol desidrogenase e/ou atividade de

triose fosfato isomerase.

Quando 1,3-propanodiol for produzido por meio do método de fabricação de produto químico de acordo com a presente invenção, a separação e a purificação de 1,3-propanodiol contido no líquido de fermentação
5 filtrado/separado podem ser conduzidas por meio de concentração e cristalização. Pode ser preferencialmente utilizado, por exemplo, método de purificação que utiliza concnetração sob pressão reduzida e recristalização exibido em JP-A nº 35785.

Quando cadaverina for produzida por meio do método de
10 fabricação de produto químico de acordo com a presente invenção, os microorganismos ou células cultivadas que podem ser utilizados na fabricação de cadaverina não são limitados, desde que sejam microorganismos ou células cultivadas que possam produzir cadaverina. Os microorganismos ou células cultivadas que podem ser preferencialmente utilizados na produção de
15 cadaverina incluem, por exemplo, microorganismos que possuem atividade de enzima de lisina des carboxilase e/ou antiportador de lisina cadaverina. Os microorganismos são, de maior preferência, microorganismos recombinantes aos quais foram integrados genes que codificam lisina descarboxilase e/ou antiportador de lisina cadaverina. Os microorganismos recombinantes são, de
20 preferência ainda maior, aqueles aos quais foram integrados um ou mais tipos de genes que codificam lisina descarboxilase.

Quando cadaverina for produzida por meio do método de fabricação de produto químico de acordo com a presente invenção, os microorganismos recombinantes são preferencialmente *Escherichia coli* e
25 bactérias corineformes, de maior preferência bactérias corineformes que possuem atividade de lisina descarboxilase e possuem pelo menos uma propriedade selecionada a partir de auxotrofia de homoserina e resistência a S-(2-aminoetil)-L-cisteína. Os microorganismos são, de maior preferência, os que

possuem deficiência na atividade de homoserina desidrogenase, de preferência ainda maior os que possuem deficiência na atividade de homoserina desidrogenase por meio de mutação com gene inserido. Na presente invenção, o gênero de bactéria corineforme é preferencialmente pelo menos um gênero selecionado a partir do grupo que consiste do gênero *Corynebacterium* e *Brevibacterium*. O microorganismo é, de maior preferência, *Corynebacterium glutamicum*.

Quando cadaverina for produzida por meio do método de fabricação de produto químico de acordo com a presente invenção, a separação e a purificação de cadaverina contida no líquido de fermentação filtrado/separado podem ser conduzidas por meio de combinação de métodos conhecidos na técnica, tais como concentração, destilação e cristalização. Pode ser preferencialmente utilizado, por exemplo, método de purificação que utiliza cristalização exibido em JP-A nº 2004-222569. Dependendo do ácido utilizado em cultivo contínuo, o produto de acordo com a presente invenção pode ser utilizado como material de diversos polímeros e, quando o produto for utilizado como material de polímero que necessita de alta pureza, é preferencialmente empregado método de purificação que utiliza cristalização. Quando o pH do cultivo for mantido com ácido clorídrico, dicloridrato de cadaverina pode ser recuperado do filtrado por meio de etapa de cristalização. É de maior preferência que o pH do cultivo seja mantido com ácido dicarboxílico durante cultivo contínuo e, a partir do filtrado, dicarboxilato de cadaverina pode ser recuperado por meio de etapa de cristalização. O ácido dicarboxílico é, de maior preferência, ácido dicarboxílico alifático e/ou aromático que contém dois grupos carboxila somente como seus grupos funcionais. O ácido dicarboxílico é, de preferência ainda maior, ácido adípico, ácido sebácico, ácido 1,12-dodecanodicarboxílico, ácido succínico, ácido isoftálico ou ácido tereftálico.

Quando ácido nucleico for produzido por meio do método de fabricação de produto químico de acordo com a presente invenção, os microorganismos ou células cultivadas que podem ser utilizados na fabricação de ácido nucleico não são limitados, desde que sejam microorganismos capazes de produzir ácido nucleico. Os microorganismos ou células cultivadas que podem ser utilizados na produção de ácido nucleico podem ser os que possuem inerentemente alta capacidade de produção de ácido nucleico separada do mundo natural, ou podem ser microorganismos procarióticos que possuem capacidade de produção artificialmente aumentada. Especificamente, os microorganismos podem ser aqueles que possuem propriedades modificadas parcialmente por meio de mutação ou recombinação genética.

É agora descrita a modificação de parte de propriedades. Para a produção eficiente de ácido nucleico, o ácido nucleico deverá ser biossintetizado, acumulado e liberado fora do microorganismo. Conseqüentemente, microorganismos ou células cultivadas que produzem eficientemente ácido nucleico podem ser criadas por meio de aprimoramento de enzima envolvida em processo de biossíntese de ácido nucleico, redução da atividade de enzima envolvida em processo de decomposição de ácido nucleico e modificações de proteína envolvida na liberação de ácido nucleico do microorganismo ou para composição de membrana biológica.

Especificamente, quando é produzida inosina, a modificação de parte de propriedades é realizada de tal forma que atividade de adenilossuccinato sintase é desejavelmente liberada ou fraca; atividade de inosinato desidrogenase é desejavelmente livre ou fraca; e atividade de nucleosidase é desejavelmente livre ou fraca. Quando é produzida guanosina, atividade de adenilossuccinato sintase é desejavelmente livre ou fraca; atividade de guanilato desidrogenase é desejavelmente livre ou fraca; atividade de nucleosidase é desejavelmente livre ou fraca; e atividade de nucleotidase é

desejavelmente livre ou fraca. Quando é produzida uridina, atividade de uridina fosforilase é desejavelmente livre ou fraca. Quando é produzida citidina, atividade de citidina desaminase é desejavelmente livre ou fraca e homosserrina desidrogenase é desejavelmente livre ou fraca.

5 Quando ácido nucleico for produzido por meio do método de fabricação de produto químico de acordo com a presente invenção, os microorganismos ou células cultivadas que podem ser utilizados são preferencialmente bactérias corineformes e *Bacillus subtilis*. As bactérias corineformes incluem bactérias pertencentes ao gênero *Corynebacterium*. As

10 bactérias do gênero *Corynebacterium* que podem ser preferencialmente utilizadas incluem *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium ammoniagenes*, *Corynebacterium guanofaciens* e *Corynebacterium petrophilium*. *Bacillus subtilis* inclui bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus*. Dentre o gênero *Bacillus*, são preferencialmente utilizados *Bacillus subtilis*,

15 *Bacillus liqueniformis* e *Bacillus pumilus*. Quando é produzida guanosina, a bactéria corineforme utilizada no presente inclui bactérias pertencentes ao gênero *Corynebacterium*. Dentre o gênero *Corynebacterium*, *Corynebacterium glutamicum* é preferível e *Bacillus subtilis* inclui bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus*. Dentre o gênero *Bacillus*, são preferencialmente utilizados

20 *Bacillus subtilis*, *Bacillus liqueniformis* e *Bacillus pumilus*. Quando uridina for produzida, pode-se utilizar *Bacillus subtilis* e, dentre as bactérias *Bacillus subtilis*, são preferencialmente utilizadas as bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus*. Dentre o gênero *Bacillus*, é preferencialmente utilizada *Bacillus subtilis*. Quando citidina for produzida, pode-se utilizar *Bacillus subtilis* e, dentre

25 as bactérias *Bacillus subtilis*, são preferencialmente utilizadas as bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus*. Dentre o gênero *Bacillus*, é preferencialmente utilizada *Bacillus subtilis*.

Quando ácido nucleico for produzido por meio do método de

fabricação de produto químico de acordo com a presente invenção, a separação e a purificação de ácido nucleico contido no líquido de fermentação filtrado/separado podem ser conduzidas preferencialmente por meio de combinação de tratamento de resina de troca de íons, recristalização por resfriamento/concentração, separação de membranas e outros métodos. Para a remoção de impurezas, pode-se utilizar recristalização e adsorção de carvão ativado convencional na purificação.

Quando aminoácido for produzido por meio do método de fabricação de produto químico de acordo com a presente invenção, os microorganismos ou células cultivadas que podem ser utilizados na fabricação de aminoácido não são limitados, desde que sejam microorganismos que possam produzir aminoácido. Os microorganismos ou células cultivadas que podem ser utilizados na produção de aminoácido podem ser os que possuem originalmente alta capacidade de produção de aminoácido separados do mundo natural, ou podem ser microorganismos ou células cultivadas que possuem capacidade de produção artificialmente aumentada. Quando aminoácido for produzido por meio do método de fabricação de produto químico de acordo com a presente invenção, o aminoácido é preferencialmente L-treonina, L-lisina, ácido L-glutâmico, L-triptofano, L-isoleucina, L-glutamina, L-arginina, L-alanina, L-histidina, L-prolina, L-fenilalanina, ácido L-aspártico, L-tirosina, metionina, serina, valina ou leucina.

São agora descritos os microorganismos ou células cultivadas que podem ser utilizados na produção de aminoácido sobre aminoácidos específicos. Quando L-treonina for produzida por meio do método de fabricação de produto químico de acordo com a presente invenção, os microorganismos ou células cultivadas que podem ser utilizados na fabricação de L-treonina podem ser microorganismos pertencentes a gênero selecionado a partir do gênero *Escherichia*, gênero *Providencia*, gênero *Corynebacterium*,

gênero *Brevibacterium* e gênero *Serratia*. Dentre eles, bactérias particularmente preferidas são *Escherichia coli*, *Providencia rettgeri*, *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium flavum*, *Brevibacterium lactofermentum* e *Serratia marcescens*.

5 Quando L-lisina for produzida por meio do método de fabricação de produto químico de acordo com a presente invenção, os microorganismos ou células cultivadas que podem ser utilizados na fabricação de L-lisina são preferencialmente *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium flavum* e *Brevibacterium lactofermentum*. Quando ácido L-glutâmico for produzido por
10 meio do método de fabricação de produto químico de acordo com a presente invenção, os microorganismos ou células cultivadas que podem ser utilizados na fabricação de ácido L-glutâmico são preferencialmente *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium flavum* e *Brevibacterium lactofermentum*.

Quando L-triptofano for produzido por meio do método de
15 fabricação de produto químico de acordo com a presente invenção, os microorganismos ou células cultivadas que podem ser utilizados na fabricação de L-triptofano são preferencialmente *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium flavum*, *Brevibacterium lactofermentum*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* e *Escherichia coli*.

20 Quando L-isoleucina for produzida por meio do método de fabricação de produto químico de acordo com a presente invenção, os microorganismos ou células cultivadas que podem ser utilizados na fabricação de L-isoleucina são preferencialmente *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium flavum*, *Brevibacterium lactofermentum* e *Serratia marcescens*.

25 Quando L-glutamina for produzida por meio do método de fabricação de produto químico de acordo com a presente invenção, os microorganismos ou células cultivadas que podem ser utilizados na fabricação de L-glutamina são preferencialmente *Corynebacterium glutamicum*,

Brevibacterium flavum, *Brevibacterium lactofermentum* e *Flavobacterium rigense*.

Quando L-arginina for produzida por meio do método de fabricação de produto químico de acordo com a presente invenção, os
5 microorganismos ou células cultivadas que podem ser utilizados na fabricação de L-arginina são preferencialmente *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium flavum*, *Serratia marcescens*, *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis*.

Quando L-alanina for produzida por meio do método de fabricação de produto químico de acordo com a presente invenção, os microorganismos
10 ou células cultivadas que podem ser utilizados na fabricação de L-alanina são preferencialmente *Brevibacterium flavum* e *Arthrobacter oxydans*.

Quando L-histidina for produzida por meio do método de fabricação de produto químico de acordo com a presente invenção, os microorganismos ou células cultivadas que podem ser utilizados na fabricação
15 de L-histidina são preferencialmente *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium flavum*, *Brevibacterium ammoniagenes*, *Serratia marcescens*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* e *Streptomyces coelicolor*.

Quando L-prolina for produzida por meio do método de fabricação de produto químico de acordo com a presente invenção, os microorganismos
20 ou células cultivadas que podem ser utilizados na fabricação de L-prolina são preferencialmente *Corynebacterium glutamicum*, *Kurthia cateniformis*, *Serratia marcescens* e *Escherichia coli*.

Quando L-fenilalanina for produzida por meio do método de fabricação de produto químico de acordo com a presente invenção, os
25 microorganismos ou células cultivadas que podem ser utilizados na fabricação de L-fenilalanina são preferencialmente *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium flavum*, *Brevibacterium lactofermentum* e *Escherichia coli*.

Quando ácido L-aspártico for produzido por meio do método de

fabricação de produto químico de acordo com a presente invenção, os microorganismos ou células cultivadas que podem ser utilizados na fabricação de ácido L-aspártico são preferencialmente *Brevibacterium flavum*, *Bacillus megatherium*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas fluorescens*.

5 Quando L-tirosina for produzida por meio do método de fabricação de produto químico de acordo com a presente invenção, os microorganismos ou células cultivadas que podem ser utilizados na fabricação de L-tirosina são preferencialmente *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium flavum*, *Brevibacterium lactofermentum* e *Escherichia coli*.

10 Quando metionina for produzida por meio do método de fabricação de produto químico de acordo com a presente invenção, os microorganismos ou células cultivadas que podem ser utilizados na fabricação de metionina são preferencialmente *Corynebacterium glutamicum*.

Quando serina for produzida por meio do método de fabricação de
15 produto químico de acordo com a presente invenção, os microorganismos ou células cultivadas que podem ser utilizados na fabricação de serina são preferencialmente *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium flavum*, *Brevibacterium lactofermentum* e *Arthrobacter oxydans*.

Quando valina for produzida por meio do método de fabricação de
20 produto químico de acordo com a presente invenção, os microorganismos ou células cultivadas que podem ser utilizados na fabricação de valina são preferencialmente *Brevibacterium lactofermentum*, *Serratia marcescens* e *Klebsiella pneumoniae*.

Quando leucina for produzida por meio do método de fabricação
25 de produto químico de acordo com a presente invenção, os microorganismos ou células cultivadas que podem ser utilizados na fabricação de leucina são preferencialmente *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium lactofermentum* e *Serratia marcescens*.

Quando aminoácido for produzido por meio do método de fabricação de produto químico de acordo com a presente invenção, os microorganismos ou células cultivadas que podem ser utilizados na fabricação de aminoácido podem ser microorganismos ou células cultivadas derivadas dos

5 exemplos de microorganismos ou células cultivadas por meio de aumento artificial da sua capacidade de produção de aminoácido. Os microorganismos ou células cultivadas que podem ser utilizados na produção de aminoácido podem ser os que possuem propriedades parcialmente modificadas por meio de mutação ou recombinação genética. Exemplos dos microorganismos ou

10 células cultivadas que possuem propriedades parcialmente modificadas que podem ser utilizadas na produção de aminoácido incluem *Providencia rettgeri* com aumento da produtividade de L-treonina descrito em JP-A nº 2-219582 e *Corynebacterium glutamicum* com aumento da produtividade de L-alanina descrita no Pedido de Patente Japonês publicado nº 3-500486.

15 Quando fermentação contínua for conduzida por meio do método de fabricação de produto químico de acordo com a presente invenção, velocidade de produção de volume mais alta que a de fermentação em bateladas convencional pode ser atingida para permitir produção por fermentação extremamente eficiente. A velocidade de produção em

20 fermentação contínua é calculada utilizando a Equação (3) a seguir:

[Equação 3]

Velocidade de produção por fermentação (g/l/h) = concentração de produto em líquido retirado (g/l) x velocidade de retirada de líquido de fermentação (l/h) ÷ quantidade de líquido corrente do aparelho (l) (3)

25 A velocidade de produção por fermentação em cultivo de bateladas é determinada por meio de divisão da quantidade (g) de produto mediante consumo de toda a fonte de carbono inicial pelo tempo (h) necessário para consumo da fonte de carbono e a quantidade (l) de líquido de cultivo

naquele momento.

É descrito agora o aparelho de fermentação contínua de acordo com a presente invenção. O aparelho de fermentação contínua de acordo com a presente invenção pode ser utilizado na produção de álcoois tais como etanol, 1,3-propanodiol, 1,4-butanodiol e glicerol, ácidos orgânicos tais como ácido acético, ácido láctico, ácido pirúvico, ácido succínico, ácido málico, ácido itacônico e ácido cítrico, aminoácidos tais como L-treonina, L-lisina, ácido L-glutâmico, L-triptofano, L-isoleucina, L-glutamina, L-arginina, L-alanina, L-histidina, L-prolina, L-fenilalanina, ácido L-aspártico, L-tirosina, metionina, serina, valina e leucina, ácidos nucleicos tais como inosina e guanosina, compostos de diamina tais como cadaverina, enzimas, antibióticos e proteínas recombinantes.

O aparelho de fermentação contínua de acordo com a presente invenção é aparelho de fabricação de produto químico por meio de fermentação contínua, que inclui a filtragem de cultivo de fermentação de microorganismo ou células cultivadas com membrana de separação para recuperar produto de filtrado, retenção simultânea de fluido não filtrado no cultivo ou envio para ele em refluxo e adição de materiais de fermentação ao cultivo de fermentação.

O aparelho de fermentação contínua de acordo com a presente invenção possui tanque de reação de fermentação para cultivo de fermentação de microorganismo ou células cultivadas.

Em uma forma, o aparelho de fermentação contínua de acordo com a presente invenção inclui tanque de separação de membrana para filtragem do cultivo de fermentação, que é conectado por meios de circulação de cultivo de fermentação ao tanque de reação de fermentação e nele equipado com membrana de separação; e meios de regulação da diferença de pressão transmembrana da membrana de separação na faixa de 0,1 a 20 kPa,

em que a membrana de separação é membrana porosa que possui tamanho médio de poro de 0,01 μm ou mais a menos de 1 μm .

Em outra forma, o aparelho de fermentação contínua de acordo com a presente invenção inclui elemento de membrana de separação para
5 filtragem do cultivo de fermentação, que é disposto no interior do tanque de reação de fermentação e equipado no seu interior com membrana de separação; meio de descarga de produto de fermentação filtrado, que é conectado ao elemento de membrana de separação; e meios de regulação da diferença de pressão transmembrana da membrana de separação na faixa de
10 0,1 a 20 kPa, em que a membrana de separação é membrana porosa que possui tamanho médio de poro de 0,01 μm ou mais a menos de 1 μm .

No aparelho de fermentação contínua de acordo com a presente invenção, o coeficiente de permeabilidade a área purificada para a membrana porosa é de preferencialmente $2 \times 10^{-9} \text{ m}^3/\text{m}^2/\text{s}/\text{Pa}$ ou mais a 6×10^{-7}
15 $\text{m}^3/\text{m}^2/\text{s}/\text{Pa}$ ou menos.

No aparelho de fermentação contínua de acordo com a presente invenção, é preferível que o tamanho médio de poro da membrana porosa seja de 0,01 μm ou mais a menos de 0,2 μm e o desvio padrão do tamanho de poro da membrana porosa seja de 0,1 μm ou menos.

20 No aparelho de fermentação contínua de acordo com a presente invenção, a membrana porosa é preferencialmente membrana porosa que possui aspereza de superfície de 0,1 μm ou menos.

No aparelho de fermentação contínua de acordo com a presente invenção, a membrana porosa é preferencialmente membrana porosa que
25 contém camada de resina porosa. No aparelho de fermentação contínua de acordo com a presente invenção, a camada de resina porosa é preferencialmente camada de resina porosa fabricada com polímero orgânico. No aparelho de fermentação contínua de acordo com a presente invenção, o

material da membrana de polímero orgânico é, de maior preferência, fluoreto de polivinilideno.

É agora descrito o aparelho de fermentação contínua utilizado no método de fabricação de produto químico de acordo com a presente invenção com referência às figuras.

A Fig. 1 é vista lateral esquemática para exibir um exemplo do aparelho de fermentação contínua do tipo separação de membranas utilizado no método de fabricação de produto químico de acordo com a presente invenção. A Fig. 1 é exemplo típico do aparelho em que elemento de membrana de separação é disposto no lado externo de tanque de reação de fermentação.

Na Fig. 1, o aparelho de fermentação contínua do tipo separação de membrana é composto essencialmente de tanque de reação de fermentação 1, camada de separação de membrana 12 e aparelho de regulação da diferença de cabeça d'água 3. O elemento de membrana de separação 2 inclui membrana porosa integrada no seu interior. Este elemento de membrana de separação utiliza preferencialmente, por exemplo, membrana de separação e elemento de membrana de separação descritos na Patente Internacional nº 2002/064240. O tanque de separação de membrana 12 é conectado por meio de bomba de circulação de líquido de fermentação 11 ao tanque de reação de fermentação 1.

Na Fig. 1, é introduzido meio por bomba de alimentação de meio 7 para o tanque de reação de fermentação 1, o líquido de fermentação no tanque de reação de fermentação 1 é agitado com agitador 5 se necessário e, se necessário, gás necessário pode ser alimentado por meio de aparelho de alimentação de gás 4. Neste momento, gás de alimentação pode ser recuperado, reciclado e novamente alimentado por meio do aparelho de alimentação de gás 4. Se necessário, o pH do líquido de fermentação é

regulado com aparelho de regulagem e sensor de pH 9 e bomba de alimentação de solução reguladora de pH 8 e, se necessário, a temperatura do líquido de fermentação é regulada por regulador de temperatura 10, por meio do quê pode ser conduzida produção por fermentação com alto rendimento. O

5 líquido de fermentação no aparelho circula entre o tanque de reação de fermentação 1 e o tanque de separação de membrana 12 por meio da bomba de circulação de líquido de fermentação 11. O líquido de fermentação que contém produto de fermentação é filtrado e separado pelo elemento de membrana de separação 2 em microorganismos e produto de fermentação que

10 pode ser retirado do sistema de aparelho em seguida. Os microorganismos filtrados/separados podem permanecer no sistema de aparelho, de forma a atingir alta densidade de microorganismos no aparelho para atingir produção de fermentação com alto rendimento. Filtragem/separação pelo elemento de membrana de separação 2 é atingida por diferença de pressão de cabeça

15 d'água a partir da superfície da água do tanque de separação de membrana 12, de forma que não necessita de potência especial. Conforme o necessário, a velocidade de filtragem/separação com o elemento de membrana de separação 2 e a quantidade do líquido de fermentação no aparelho podem ser adequadamente controladas com o sensor de nível 6 e o aparelho de

20 regulagem da diferença de pressão de cabeça d'água 3. Conforme o necessário, gás necessário pode ser alimentado por meio do aparelho de alimentação de gás 4 para o tanque de separação de membrana 12. O ar alimentado pode ser recuperado, reciclado e novamente alimentado por meio do aparelho de alimentação de gás 4. Filtragem/separação por meio do

25 elemento de membrana de separação 2 pode também ser atingida por meio de filtragem de sucção com bomba ou similar ou de pressurização no sistema de aparelho. Microorganismos ou células cultivadas podem ser cultivadas continuamente em tanque de cultivo e alimentadas conforme o necessário para

o fermentador. Cultivando-se os microorganismos ou células cultivadas em tanque de cultivo e alimentando-os conforme o necessário para o fermentador, fermentação contínua com microorganismos ou células cultivadas sempre novas que possuem alta capacidade de fabricação de produto químico é
5 possibilitada para permitir fermentação contínua com alto desempenho produtivo mantido por longo tempo.

A Fig. 2 é vista lateral esquemática para explicar outro exemplo do aparelho de fermentação contínua do tipo separação de membranas utilizado na presente invenção. Exemplo típico do aparelho de fermentação
10 contínua em que elemento de membrana de separação é disposto no interior do tanque de reação de fermentação utilizado no método de fabricação de produto químico de acordo com a presente invenção é exibido na vista esquemática da Fig. 2.

Na Fig. 2, o aparelho de fermentação contínua do tipo separação
15 de membrana é composto essencialmente de tanque de reação de fermentação 1 e aparelho de regulação da diferença de cabeça d'água 3. Membrana porosa é integrada em elemento de membrana de separação 2 no tanque de reação de fermentação 1. Esta membrana porosa pode utilizar, por exemplo, membrana de separação e elemento de membrana de separação
20 descritos na Patente Internacional nº 2002/064240. O elemento de membrana de separação será descrito com mais detalhes posteriormente.

Em seguida, é descrita em detalhes a fermentação contínua no aparelho contínuo do tipo separação de membrana da Fig. 2.

Meio é introduzido contínua ou intermitentemente por meio de
25 bomba de alimentação de meio 7 para o tanque de reação de fermentação 1. Se necessário, o meio pode haver sido esterilizado por meio de aquecimento ou submetido a esterilização com filtro antes da introdução no tanque de reação de fermentação. Durante a produção de fermentação, o líquido de

fermentação no tanque de reação de fermentação 1 é agitado, se necessário, com agitador 5 no tanque de reação de fermentação 1. No momento da produção de fermentação, gás necessário pode ser alimentado, se necessário, por meio de aparelho de alimentação de gás 4 para o tanque de reação de fermentação 1. No momento da produção por fermentação, o pH do líquido de fermentação no tanque de reação de fermentação 1 é regulado, se necessário, com aparelho de regulação e sensor de pH 9 e bomba de alimentação de solução reguladora de pH 8 e a temperatura do líquido de fermentação no tanque de reação de fermentação 1 é regulada, se necessário, por regulador de temperatura 10, por meio do que pode ser conduzida produção por fermentação com alto rendimento. Neste exemplo, pH e temperatura são ilustrados como condições físico-químicas do líquido de fermentação a serem reguladas com aparelhos de medição e aparelhos de controle, mas, se necessário, oxigênio dissolvido ou ORP podem ser regulados, ou a concentração de produto químico no líquido de fermentação é medida com analisador tal como sensor químico on-line e condições físico-químicas podem ser reguladas utilizando, como indicador, a concentração de produto químico no líquido de fermentação. Em introdução contínua ou intermitente do meio, é preferível que a quantidade e a velocidade do meio introduzido sejam reguladas adequadamente utilizando, como indicador, certo valor de medição no ambiente físico-químico do líquido de fermentação com o aparelho de medição.

Na Fig. 2, o líquido de fermentação é filtrado e separado em microorganismos e produto de fermentação por elemento de membrana de separação 2 instalado no tanque de reação de fermentação 1 e o produto de fermentação pode ser retirado do sistema de aparelho. Os microorganismos filtrados/separados permanecem no sistema de aparelho, de forma a atingir alta densidade de microorganismos no sistema de aparelho para alcançar

produção por fermentação com alto rendimento. Filtragem/separação com o elemento de membrana de separação 2 é atingida por diferença de pressão de cabeça d'água a partir da superfície da água do tanque de reação de fermentação 1, de forma que não necessita de potência especial. Conforme o necessário, a velocidade de filtragem/separação com o elemento de membrana de separação 2 e a quantidade do líquido de fermentação no tanque de reação de fermentação 1 podem ser adequadamente controladas com sensor de nível 6 e aparelho de regulação da diferença de pressão de cabeça d'água 3. Filtragem/separação por meio do elemento de membrana de separação podem também ser atingidas por meio de filtragem de sucção com bomba ou similar ou de pressurização no sistema de aparelho, se necessário. Microorganismos ou células cultivadas podem ser cultivadas continuamente em tanque de cultivo e alimentadas conforme o necessário para o fermentador. Cultivando-se os microorganismos ou células cultivadas em tanque de cultivo e alimentando-os conforme o necessário para o fermentador, fermentação contínua com microorganismos ou células cultivadas sempre novas que possuem alta capacidade de fabricação de produto químico é possibilitada para permitir a manutenção de fermentação contínua com alto desempenho produtivo por longo tempo.

É agora descrito o elemento de membrana de separação utilizado preferencialmente no aparelho de fermentação contínua empregado no método de fabricação de produto químico de acordo com a presente invenção.

É descrito o elemento de membrana de separação exibido na Fig. 3. Membrana de separação e elemento de membrana de separação descritos na Patente Internacional nº 2002/064240 podem ser preferencialmente utilizados no aparelho de fermentação contínua utilizado no método de fabricação de produto químico de acordo com a presente invenção. Conforme exibido na Fig. 3, o elemento de membrana de separação é constituído pela

disposição de material de passagem 14 e da membrana de separação 15, nesta ordem, sobre os dois lados de placa de sustentação 13 que possui rigidez. A placa de sustentação 13 possui parte côncava 16 sobre os seus dois lados. A membrana de separação 15 filtra o líquido de fermentação. Pelo material de passagem 14, água permeada filtrada através da membrana de separação 15 flui eficientemente para a placa de sustentação 13. A água permeada que fluiu para a placa de sustentação 13 passa através da parte côncava 16 da placa de sustentação 13 e é descarregada por meio de cano de coleta de água 17 para o lado externo do tanque de cultivo de fermentação. A potência de descarga da água permeada pode ser gerada por meio de método que utiliza diferença de pressão de cabeça d'água, filtragem de sucção com bomba, líquido, gás ou similar, ou pressurização no aparelho.

É descrito agora o elemento de membrana de separação exibido na Fig. 4. Conforme exibido na Fig. 4, o elemento de membrana de separação é composto essencialmente de feixes de membranas de separação 18 compostos de membranas de fibra oca, camada de vedação de resina superior 19 e camada de vedação de resina inferior 20. O feixe de membranas de separação é unido e fixado na forma de feixe pela camada de vedação de resina superior 19 e a camada de vedação de resina inferior 20. Por meio de união/fixação com a camada de vedação de resina inferior, o oco da membrana de fibra oca é vedado para evitar vazamento do cultivo de fermentação. Por outro lado, a camada de vedação de resina superior 19 não veda o orifício interno da membrana de fibra oca, para permitir o fluxo de água permeada para o cano de coleta de água 22. Este elemento de membrana de separação pode ser disposto por meio de quadro de sustentação 21 no aparelho de fermentação contínua. A água permeada filtrada através do feixe de membranas de separação 18 passa através do espaço oco da membrana de fibra oca e é descarregada por meio do cano de coleta de água 22 para o lado

externo do tanque de cultivo de fermentação. A potência de descarga da água permeada pode ser gerada por meio de método que utiliza diferença de pressão de cabeça d'água, filtragem de sucção com bomba, líquido, gás ou similar, ou pressurização no aparelho.

5 O material que constitui o elemento de membrana de separação do aparelho de fermentação contínua utilizado no método de fabricação de produto químico de acordo com a presente invenção é preferencialmente membro resistente a esterilização a vapor sob alta pressão. Caso o lado interno do aparelho de fermentação possa ser esterilizado, pode-se evitar
10 contaminação com microorganismos desfavoráveis durante fermentação contínua, para permitir fermentação contínua mais estável. O membro que constitui o elemento de membrana de separação é preferencialmente resistente às condições (121 °C, quinze minutos) de esterilização a vapor sob alta pressão. O material do membro de elemento de membrana de separação pode
15 ser adequadamente selecionado, por exemplo, a partir de metais tais como aço inoxidável e alumínio e resinas tais como resina de poliamida, resina de flúor, resina de policarbonato, resina poliacetal, resina de tereftalato de polibutileno, PVDF, resina de polifenileno éter modificado e resina de polissulfona.

No aparelho de fermentação contínua utilizado no método de
20 fabricação de produto químico de acordo com a presente invenção, o elemento de membrana de separação pode ser instalado fora do tanque de fermentação ou pode ser instalado dentro do tanque de fermentação. No caso de instalação fora do tanque de fermentação, o elemento de membrana de separação pode ser instalado em tanque de separação de membrana disposto separadamente
25 para circular o líquido de fermentação entre o tanque de fermentação e o tanque de separação de membrana, durante o quê o líquido de fermentação pode ser filtrado continuamente através do elemento de membrana de separação.

No aparelho de fermentação contínua utilizado no método de fabricação de produto químico de acordo com a presente invenção, o tanque de separação de membrana é desejavelmente capaz de esterilização a vapor sob alta pressão. Caso o tanque de separação de membrana seja capaz de esterilização a vapor sob alta pressão, pode-se facilmente evitar a contaminação devido a bactérias saprofíticas.

EXEMPLOS

A seguir, a fim de explicar a presente invenção em mais detalhes, realizações específicas nas quais ácido D-láctico, etanol, ácido pirúvico, ácido succínico, 1,3-propanodiol, ácido itacônico, cadaverina, ácido nucleico e aminoácido foram selecionados como o produto químico e microorganismo ou células cultivadas que possuem capacidade de fabricar cada produto químico foram utilizados em fermentação contínua utilizando os aparelhos exibidos nas vistas esquemáticas nas Figs. 1 e 2 são descritas com referência aos Exemplos.

EXEMPLO DE REFERÊNCIA 1

PREPARAÇÃO DE LINHAGEM DE LEVEDURA QUE POSSUI CAPACIDADE DE PRODUÇÃO DE ÁCIDO L-LÁCTICO

Linhagem de leveduras que possui capacidade de produção de ácido L-láctico foi criada conforme segue. Gene LDH derivado de seres humanos foi ligado abaixo no fluxo de promotor PDC1 sobre genoma de levedura, de forma a criar linhagem de leveduras que possui capacidade de produção de ácido L-láctico. Reação em cadeia de polimerase (PCR) foi conduzida utilizando La-Taq (Takara Shuzo Co., Ltd.) ou KOD-Plus-polimerase (TOYOBO CO., LTD.) de acordo com as suas instruções anexas.

Após o cultivo e recuperação de linhagem celular estabelecida de câncer de mama humano (MCF-7), o RNA total foi extraído utilizando Reagente TRIZOL (Invitrogen). Utilizando o RNA total resultante como modelo, reação de

transcrição reversa foi conduzida utilizando Sistema de Seleção SuperScript (Invitrogen) para sintetizar cDNA. Os detalhes da operação foram de acordo com os protocolos anexos. O cDNA obtido desta forma foi utilizado como modelo de amplificação para PCR subsequente.

5 Gene L-Ildh foi clonado por meio de PCR com KOD-Plus-polimerase e conjunto de primers de oligonucleotídeos descrito em SEQ ID Nº 1 e 2, em que o cDNA obtido por meio da operação acima foi utilizado como modelo de amplificação. Cada fragmento de amplificação de PCR foi purificado, fosforilado em seguida no seu término com T4 polinucleotídeo
10 quinase (fabricada pela TAKARA) e ligado a vetor pUC118 (que havia sido tratado por meio de divisão com enzima de restrição HincII e submissão em seguida da superfície de divisão a desfosforilação). Esta ligação foi conduzida com kit de ligação de DNA Ver. 2 (fabricado pela TAKARA). O produto de plasmídeo de ligação foi utilizado para transformar *Escherichia coli* DH5 α do
15 qual DNA de plasmídeo foi recuperado em seguida para gerar plasmídeos em que vários genes L-Ildh (SEQ ID Nº 3) haviam sido subclonados. Os plasmídeos pUC118 resultantes nos quais o gene L-Ildh havia sido inserido foram digeridos com enzimas de restrição XhoI e NotI e cada um dos fragmentos de DNA resultantes foi inserido em local de divisão XhoI/NotI de vetor de expressão de
20 levedura pTRS11 (Fig. 5). O plasmídeo de expressão de gene L-Ildh derivado de seres humanos pL-Ildh5 (gene L-Ildh) foi obtido desta forma. O pL-Ildh5 mencionado acima que é vetor de expressão de gene L-Ildh derivado de seres humanos foi depositado como plasmídeo isolado sob FERM AP-20421 em 21 de fevereiro de 2005 junto ao Depositário do Organismo Internacional de
25 Patentes (IPOD), Instituto Nacional de Tecnologia e Ciência Industrial Avançada (AIST) (Central 6, 1-1-1 Higashi, Cidade de Tsukuba, Prefeitura de Ibaraki, Japão).

Fragmento de DNA com 1,3 kb que contém o gene LDH derivado

de seres humanos e sequência de término de gene TDH3 derivado de *Saccharomyces cerevisiae* foi amplificada por meio de PCR com conjunto de primers de oligonucleotídeos descrito em SEQ ID Nº 4 e 5, em que o plasmídeo pL-ldh5 que contém o gene LDH derivado de seres humanos foi utilizado como modelo de amplificação. Fragmento de DNA com 1,2 kb que contém gene TRP1 derivado de *Saccharomyces cerevisiae* foi amplificado por meio de PCR com conjunto de primers de oligonucleotídeos descrito em SEQ ID Nº 6 e 7 e o plasmídeo pRS424 na forma de modelo de amplificação. Os fragmentos de DNA correspondentes foram separados por meio de eletroforese de gel de agarose a 1,5% e purificados de forma habitual. Mistura dos fragmentos de 1,3 kb e 1,2 kb obtidos desta forma foi utilizada como modelo de amplificação em PCR com conjunto de primers de oligonucleotídeos descritos em SEQ ID Nº 4 e 7 para gerar produtos que foram submetidos em seguida a eletroforese de gel de agarose a 1,5% para preparar fragmento de DNA de 2,5 kb que consiste do gene LDH derivado de seres humanos e do gene TRP1 a ele ligado de forma habitual. Este fragmento de DNA de 2,5 kb foi transformado de forma habitual em linhagem de levedura de enxerto NBRC10505, de forma a torná-lo triptofano não auxotrófico.

O fato de que as células transformadas resultantes foram aquelas que contém o gene LDH derivado de seres humanos ligado abaixo no fluxo de promotor de PDC1 sobre genoma de levedura foi confirmado pela preparação, em primeiro lugar, do DNA de genoma da célula transformada de forma habitual, utilizando-o como modelo de amplificação em PCR com conjunto de primer de oligonucleotídeos descritos em SEQ ID Nº 8 e 9 para gerar fragmento de DNA de amplificação com 0,7 kb. A capacidade ou não de produção de ácido láctico pelas células transformadas foi confirmada por meio de determinação, em HPLC sob as condições a seguir, da quantidade de ácido láctico contida em sobrenadante de cultivo das células transformadas cultivadas em meio SC

(*Methods in Yeast Genetics*, Edição 2000, CSHL Press).

Coluna: Shim-Pack SPR-H (fabricada pela Shimadzu Corporation)

Fase móvel: 5 mM de ácido p-toluenossulfônico (velocidade de fluxo de 0,8 ml/min)

5 Solução de reação: 5 mM de ácido p-toluenossulfônico, 20 mM de Bis-Tris, 0,1 mM de EDTA·2 Na (velocidade de fluxo de 0,8 ml/min)

Método de detecção: condutividade elétrica

Temperatura: 45 °C

A pureza ótica de ácido L-láctico foi medida por meio de HPLC
10 sob as condições a seguir.

Coluna: TSK-gel Enantio L1 (fabricada pela Tosoh Corporation)

Fase móvel: 1 mM de solução aquosa de sulfato de cobre

Velocidade de fluxo: 1,0 ml/min

Método de detecção: UV 254 nm

15 Temperatura: 30 °C

A pureza ótica de ácido L-láctico é calculada utilizando a equação a seguir:

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

em que L representa a concentração de ácido L-láctico e D
20 representa a concentração de ácido D-láctico.

Como resultado da análise de HPLC, 4 g/l de ácido L-láctico foram detectados e ácido D-láctico estava abaixo do limite de detecção. A partir do estudo acima, confirmou-se que este transformador possui capacidade de produção de ácido L-láctico. As células transformadas resultantes foram
25 utilizadas como linhagem de levedura SW-1 nos Exemplos abaixo.

EXEMPLO DE REFERÊNCIA 2

PREPARAÇÃO DE MEMBRANA POROSA (Nº 1)

Resina de fluoreto de polivinilideno (PVDF) e N,N-

dimetilacetamida foram utilizadas como resina e solvente, respectivamente, e agitadas suficientemente sob temperatura de 90 °C para gerar solução padrão que possui a composição a seguir:

fluoreto de polivinilideno: 13,0% em peso; e

5 N,N-dimetilacetamida: 87,0% em peso

Em seguida, a solução padrão foi resfriada até temperatura de 25 °C, aplicada em seguida sobre tecido não tecido de fibra de poliéster que possui densidade de 0,48 g/cm³ e espessura de 220 µm previamente fixado a placa de vidro e que foi imediatamente mergulhado por cinco minutos em
10 banho de coagulação sob temperatura de 25 °C que possui a composição a seguir, para gerar material base poroso que contém camada de resina porosa formada sobre ele.

Água: 30,0% em peso

N,N-dimetilacetamida: 70,0% em peso

15 Este material base poroso foi destacado da placa de vidro, mergulhado por três vezes em água quente sob temperatura de 80 °C, de forma a ser lavado para remover N,N-dimetilacetamida, para gerar membrana de separação.

A superfície da camada de resina porosa em área de 9,2 µm x
20 10,4 µm foi observada em ampliação de dez mil vezes sob microscópio eletrônico de varrimento. O diâmetro médio de todos os poros observáveis foi de 0,1 µm.

Em seguida, a membrana de separação foi avaliada para determinar o seu coeficiente de permeabilidade a água purificada. A medição
25 do coeficiente de permeabilidade a água purificada foi conduzida com água purificada tratada com membrana de osmose reversa a 25 °C com altura de cabeça de um metro.

O desvio padrão do tamanho médio de poro foi de 0,035 µm e a

aspereza da superfície da membrana foi de 0,06 μm . A membrana porosa preparada desta forma poderá ser preferencialmente utilizada na presente invenção.

EXEMPLO DE REFERÊNCIA 3

5

PREPARAÇÃO DE MEMBRANA POROSA (Nº 2)

Resina de fluoreto de polivinilideno (PVDF) foi utilizada como resina, polietileno glicol (PEG) que possui peso molecular de cerca de 20.000 como agente formador de poros, N,N-dimetilacetamida como solvente e água purificada como não solvente e estes materiais foram agitados suficientemente sob temperatura de 90 °C para gerar solução padrão que possui a composição a seguir:

Fluoreto de polivinilideno: 13,0% em peso

Polietileno glicol: 5,5% em peso

N,N-dimetilacetamida: 78,0% em peso; e

15

Água purificada: 3,5% em peso.

Em seguida, a solução padrão foi resfriada até temperatura de 25 °C, aplicada em seguida sobre tecido não tecido de fibra de poliéster que possui densidade de 0,48 g/cm³ e espessura de 220 μm , imediatamente mergulhada por cinco minutos em água purificada a 25 °C, mergulhada por três vezes em água quente a 80 °C, de forma a ser lavada para remover N,N-dimetilacetamida e polietileno glicol para gerar membrana de separação.

20

A superfície da camada de resina porosa em área de 9,2 μm x 10,4 μm no local da membrana de separação à qual havia sido aplicada a solução padrão foi observada em ampliação de dez mil vezes sob microscópio eletrônico de varrimento. O diâmetro médio de todos os poros observáveis foi de 0,02 μm .

25

A membrana de separação foi avaliada para determinar o seu coeficiente de permeabilidade a água purificada. O coeficiente de

permeabilidade a água purificada foi de $2 \times 10^{-9} \text{ m}^3/\text{m}^2 \cdot \text{s} \cdot \text{Pa}$. A medição do coeficiente de permeabilidade a água purificada foi conduzida com água purificada tratada com membrana de osmose reversa a 25 °C com altura de cabeça de um metro.

- 5 O desvio padrão do tamanho médio de poro foi de $0,0055 \mu\text{m}$ e a aspereza da superfície da membrana foi de $0,1 \mu\text{m}$. A membrana porosa preparada desta forma poderá ser preferencialmente utilizada na presente invenção.

EXEMPLO DE REFERÊNCIA 4

PREPARAÇÃO DE MEMBRANA POROSA (Nº 3)

Membrana de separação foi obtida da mesma forma do Exemplo de Referência 3, exceto pelo uso de solução padrão que possui a composição a seguir:

Fluoreto de polivinilideno: 13,0% em peso

- 15 Polietileno glicol: 5,5% em peso

N,N-dimetilacetamida: 81,5% em peso.

- A superfície da camada de resina porosa em área de $9,2 \mu\text{m} \times 10,4 \mu\text{m}$ no local da membrana de separação à qual havia sido aplicada a solução padrão foi observada em ampliação de dez mil vezes sob microscópio eletrônico de varrimento. O diâmetro médio de todos os poros observáveis foi de $0,19 \mu\text{m}$.

- O coeficiente de permeabilidade a água purificada avaliado desta membrana de separação foi de $100 \times 10^{-9} \text{ m}^3/\text{m}^2 \cdot \text{s} \cdot \text{Pa}$. A medição do coeficiente de permeabilidade a água purificada foi conduzida com água purificada tratada com membrana de osmose reversa a 25 °C com altura de cabeça de um metro.

O desvio padrão do tamanho médio de poro foi de $0,060 \mu\text{m}$ e a aspereza da superfície da membrana foi de $0,08 \mu\text{m}$. A membrana porosa

preparada desta forma poderá ser preferencialmente utilizada na presente invenção.

EXEMPLO DE REFERÊNCIA 5

PREPARAÇÃO DE MEMBRANA POROSA (Nº 4)

5 Resina de fluoreto de polivinilideno (PVDF) e N,N-dimetilacetamida foram utilizadas como resina e solvente, respectivamente, e agitadas suficientemente sob temperatura de 90 °C para gerar solução padrão que possui a composição a seguir:

Fluoreto de polivinilideno: 15,0% em peso; e

10 N,N-dimetilacetamida: 85,0% em peso

Em seguida, a solução padrão foi resfriada até temperatura de 25 °C, aplicada em seguida sobre tecido não tecido de fibra de poliéster que possui densidade de 0,48 g/cm³ e espessura de 220 µm previamente fixado a placa de vidro e que foi imediatamente mergulhado por cinco minutos em
15 banho de coagulação sob temperatura de 25 °C que possui a composição a seguir, para gerar material base poroso que contém camada de resina porosa formada sobre ele.

Água: 100,0% em peso

Este material de base porosa foi destacado da placa de vidro,
20 mergulhada por três vezes em água quente sob temperatura de 80 °C, de forma a ser lavado para remover N,N-dimetilacetamida, para gerar membrana de separação. A superfície da camada de resina porosa em área de 9,2 µm x 10,4 µm foi observada em ampliação de dez mil vezes sob microscópio eletrônico de varrimento. O diâmetro médio de todos os poros observáveis foi
25 de 0,008 µm. O coeficiente de permeabilidade a água purificada avaliado desta membrana de separação foi de $0,3 \times 10^{-9} \text{ m}^3/\text{m}^2 \cdot \text{s} \cdot \text{Pa}$. A medição do coeficiente de permeabilidade a água purificada foi conduzida com água purificada tratada com membrana de osmose reversa a 25 °C com altura de cabeça de um metro.

O desvio padrão do tamanho médio de poro foi de 0,002 μm e a aspereza da superfície da membrana foi de 0,06 μm .

EXEMPLO 1

PRODUÇÃO DE ÁCIDO L-LÁCTICO POR MEIO DE FERMENTAÇÃO CONTÍNUA

UTILIZANDO LEVEDURA (Nº 1)

A produção de ácido L-láctico foi conduzida utilizando o aparelho de fermentação contínua do tipo separação de membrana da Fig. 1 e meio de fermentação de ácido láctico de levedura que possui a composição exibida na Tabela 1. O meio foi utilizado após esterilização a vapor em alta pressão (121 °C, quinze minutos). Como material de elemento de membrana de separação, utilizou-se moldagem de resina de polissulfona e aço inoxidável. Como membrana de separação, foi utilizada a membrana porosa preparada no Exemplo de Referência 2. A menos que indicado em contrário, as condições de operação do Exemplo 1 são as seguintes:

- 15 Capacidade de tanque de reação: 2 (L)
- Capacidade do tanque de separação de membrana: 0,5 (L)
- Membrana de separação utilizada: membrana de filtração de fluoreto de polivinilideno
- Área de filtração eficaz do elemento de separação de membrana:
- 20 60 cm^2
- Controle de temperatura: 30 (°C)
- Aeração do tanque de reação: 0,05 (l/min)
- Aeração do tanque de separação de membrana: 0,3 (l/min)
- Velocidade de agitação do tanque de reação: 100 (rpm)
- 25 Ajuste de pH: ajustado em pH 5 com 1 N NaOH
- Velocidade de alimentação do meio de fermentação de ácido láctico: controle variável na faixa de 50 a 300 ml/h.
- Quantidade de líquido em circulação com aparelho de circulação

de líquido de fermentação: 0,1 (l/min)

Regulagem da quantidade de água de permeação da membrana:
regulagem da velocidade de fluxo por diferença de pressão transmembrana

(do início da fermentação contínua até cem horas: regulada em

5 0,1 kPa ou mais a 5 kPa ou menos;

- 100 horas a 200 horas: regulada em 0,1 kPa ou mais a 2
kPa ou menos; e

- 200 horas a 300 horas: regulada em 0,1 kPa ou mais a 20
kPa ou menos).

10 Levedura SW-1 criada no Exemplo de Referência 1 foi utilizada
como microorganismo, meio de fermentação de ácido láctico que possui a
composição exibida na Tabela 1 foi utilizada como meio, a concentração de
ácido láctico na forma de produto foi avaliada por meio de HPLC exibida no
Exemplo de Referência 1 e a concentração de glicose foi medida com Teste de
15 Glicose Wako C (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.).

TABELA 1

MEIO DE FERMENTAÇÃO DE ÁCIDO LÁCTICO DE LEVEDURA

Glicose	100 g
Base de nitrogênio de levedura sem aminoácido (Difco)	6,7 g
Padrão 19 aminoácidos excluindo leucina	152 mg
Leucina	760 mg
Inositol	152 mg
Ácido p-aminobenzóico	16 mg
Adenina	40 mg
Uracil	152 mg

Unidade (1/litro)

Em primeiro lugar, a linhagem de SW-1 foi cultivada com agitação por uma noite em 5 ml de meio de fermentação de ácido láctico em tubo de ensaio (antes do cultivo prévio preliminar). O cultivo resultante foi inoculado em 100 ml de meio de fermentação de ácido láctico novo e cultivado com agitação por 24 horas a 30 °C em frasco Sakaguchi de 500 ml (cultivo prévio preliminar). O cultivo prévio preliminar foi inoculado em 1,5 l de meio de fermentação de ácido láctico no aparelho de fermentação contínua do tipo de separação de membrana exibido na Fig. 1, tanque de reação 1 foi agitado com agitador a ele fixado, seguido pela regulação de aeração, controle de temperatura e ajuste de pH do tanque de reação 1 e, sem operar bomba de circulação de líquido de fermentação 10, o microorganismo foi cultivado por 24 horas (cultivo prévio). Imediatamente após o término do cultivo prévio, a bomba de circulação de líquido de fermentação 10 foi operada e o microorganismo foi cultivado continuamente sob as condições em que, além das condições de operação no momento do cultivo prévio, tanque de separação de membrana 2 foi aerado, meio de fermentação de ácido láctico foi alimentado continuamente e a quantidade de água de permeação de membrana foi regulada de tal forma que a quantidade do líquido de fermentação no aparelho de fermentação contínua do tipo separação de membrana tornou-se 2 L, por meio do quê ácido L-láctico foi produzido por meio de fermentação contínua. Neste teste de fermentação contínua, a quantidade de água de permeação de membrana foi regulada e alterada sob as condições de controle de água de permeação de membrana descritas acima, durante o quê a diferença de cabeça d'água foi medida como a diferença de pressão transmembrana com aparelho de regulação de diferença de cabeça d'água 3. A concentração de ácido L-láctico produzida no líquido de fermentação de permeação de membrana e a concentração de glicose residual foram medidas em momento apropriado.

Os resultados no teste de fermentação contínua por trezentas

horas são exibidos na Tabela 2. A produção de ácido L-láctico por meio de fermentação contínua estável foi viável por meio do método de fabricação de produto químico de acordo com a presente invenção utilizando o aparelho de fermentação contínua do tipo de separação de membrana da Fig. 1. A
5 diferença de pressão transmembrana variou dentro de 2 kPa em todo o período de fermentação contínua.

EXEMPLO 2

PRODUÇÃO DE ÁCIDO L-LÁCTICO POR MEIO DE FERMENTAÇÃO CONTÍNUA

UTILIZANDO LEVEDURA (Nº 2)

10 O mesmo teste de fermentação contínua de ácido L-láctico do Exemplo 1 foi conduzido utilizando a membrana porosa do Exemplo de Referência 3 como membrana de separação. Os resultados são exibidos na Tabela 2. Como resultado, tornou-se viável a produção estável de ácido L-láctico por meio de fermentação contínua. A diferença de pressão
15 transmembrana variou dentro de 2 kPa em todo o período de fermentação contínua.

EXEMPLO 3

PRODUÇÃO DE ÁCIDO L-LÁCTICO POR MEIO DE FERMENTAÇÃO CONTÍNUA

UTILIZANDO LEVEDURA (Nº 3)

20 O mesmo teste de fermentação contínua de ácido L-láctico do Exemplo 1 foi conduzido utilizando a membrana porosa do Exemplo de Referência 4 como membrana de separação. Os resultados são exibidos na Tabela 2. Como resultado, tornou-se viável a produção estável de ácido L-láctico por meio de fermentação contínua. A diferença de pressão transmembrana
25 variou dentro de 2 kPa em todo o período de fermentação contínua.

EXEMPLO 4

PRODUÇÃO DE ÁCIDO L-LÁCTICO POR MEIO DE FERMENTAÇÃO CONTÍNUA

UTILIZANDO LEVEDURA (Nº 4)

A produção de ácido L-láctico foi conduzida utilizando o aparelho de fermentação contínua da Fig. 2 e meio de fermentação de levedura que possui a composição exibida na Tabela 1. O meio foi utilizado após esterilização a vapor em alta pressão (121 °C, quinze minutos). Como material de elemento

5 de membrana de separação, utilizou-se moldagem de resina de polissulfona e aço inoxidável. Como membrana de separação, foi utilizada a membrana porosa preparada no Exemplo de Referência 1. A menos que indicado em contrário, as condições de operação deste exemplo são as seguintes:

Capacidade de tanque de reação: 2 (L)

10 Membrana de separação utilizada: membrana de filtração de fluoreto de polivinilideno

Área de filtração eficaz do elemento de separação de membrana:
120 cm²

Controle de temperatura: 30 (°C)

15 Aeração do tanque de reação de fermentação: 0,05 (l/min)

Velocidade de alimentação do meio de fermentação de ácido láctico: controle variável na faixa de 50 a 300 ml/h.

Velocidade de agitação do tanque de reação de fermentação: 800 (rpm)

20 Ajuste de pH: ajustado em pH 5 com 1 N NaOH

Regulagem da quantidade de água de permeação da membrana: regulagem da velocidade de fluxo por diferença de pressão transmembrana

(do início da fermentação contínua até 80 horas: regulada em 0,1 kPa ou mais a 5 kPa ou menos;

25 - 80 horas a 160 horas: regulada em 0,1 kPa ou mais a 2 kPa ou menos; e

- 160 horas a 240 horas: regulada em 0,1 kPa ou mais a 20 kPa ou menos).

Esterilização: o tanque de cultivo, incluindo o elemento de membrana de separação, e o meio utilizado, foram esterilizados com vapor sob alta pressão em autoclave a 121 °C por vinte minutos.

A levedura SW-1 criada no Exemplo de Referência 1 foi utilizada
5 como microorganismo, meio de fermentação de ácido láctico que possui a composição exibida na Tabela 1 foi utilizada como meio, a concentração de ácido L-láctico na forma de produto foi avaliada por meio de HPLC exibida no Exemplo de Referência 1 e a concentração de glicose foi medida com Teste de Glicose Wako C (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.).

10 Em primeiro lugar, a linhagem de SW-1 foi cultivada com agitação por uma noite em 5 ml de meio de fermentação de ácido láctico em tubo de ensaio (antes do cultivo prévio preliminar). O cultivo resultante foi inoculado em 100 ml de meio de fermentação de ácido láctico novo e cultivado com agitação por 24 horas a 30 °C em frasco Sakaguchi de 500 ml (cultivo prévio preliminar).

15 O cultivo prévio preliminar foi inoculado em 1,5 l de meio de fermentação de ácido láctico no aparelho de fermentação contínua do tipo de separação de membrana exibido na Fig. 2, tanque de reação 1 foi agitado a 400 rpm com agitador 5 a ele fixado, seguido pela regulação de aeração, controle de temperatura e ajuste de pH do tanque de reação 1 e o microorganismo foi
20 cultivado por 24 horas (cultivo prévio). Imediatamente após o término do cultivo prévio, o microorganismo foi cultivado continuamente com meio de fermentação de ácido láctico alimentado continuamente e com a quantidade de água de permeação de membrana regulada de tal forma que a quantidade do líquido de fermentação no aparelho de fermentação contínua do tipo de
25 separação de membrana tornou-se 1,5 l, por meio do quê foi produzido ácido L-láctico por meio de fermentação contínua. Neste teste de fermentação contínua, a quantidade de água de permeação de membrana foi regulada e alterada sob as condições de controle de água de permeação de membrana

descritas acima, durante o quê a diferença de cabeça d'água foi medida como a diferença de pressão transmembrana com aparelho de regulação de diferença de cabeça d'água 3. A concentração de ácido L-láctico produzida no líquido de fermentação de permeação de membrana e a concentração de glicose residual foi medida em momento apropriado. O rendimento de ácido L-láctico em açúcar e a velocidade de produção de ácido L-láctico calculada a partir do ácido L-láctico e glicose introduzida calculada a partir da concentração de glicose são exibidos na Tabela 2.

Como resultado do teste de fermentação por 240 horas, produção estável de ácido L-láctico por meio de fermentação contínua foi viável por meio do método de fabricação de produto químico de acordo com a presente invenção utilizando o aparelho de fermentação contínua da Fig. 2. A diferença de pressão transmembrana variou dentro de 2 kPa em todo o período de fermentação contínua.

EXEMPLO 5

PRODUÇÃO DE ÁCIDO L-LÁCTICO POR MEIO DE FERMENTAÇÃO CONTÍNUA

UTILIZANDO LEVEDURA (Nº 5)

O mesmo teste de fermentação contínua de ácido L-láctico do Exemplo 4 foi conduzido utilizando a membrana porosa preparada no Exemplo de Referência 3 como membrana de separação. Os resultados são exibidos na Tabela 2. Como resultado, tornou-se viável a produção estável de ácido L-láctico por meio de fermentação contínua. A diferença de pressão transmembrana variou dentro de 2 kPa em todo o período de fermentação contínua.

EXEMPLO 6

PRODUÇÃO DE ÁCIDO L-LÁCTICO POR MEIO DE FERMENTAÇÃO CONTÍNUA

UTILIZANDO LEVEDURA (Nº 6)

O mesmo teste de fermentação contínua de ácido L-láctico do Exemplo 5 foi conduzido utilizando a membrana porosa preparada no Exemplo

de Referência 4 como membrana de separação. Os resultados são exibidos na Tabela 2. Como resultado, tornou-se viável a produção estável de ácido L-láctico por meio de fermentação contínua. A diferença de pressão transmembrana variou dentro de 2 kPa em todo o período de fermentação contínua.

5

EXEMPLO COMPARATIVO 1

PRODUÇÃO DE ÁCIDO L-LÁCTICO POR MEIO DE FERMENTAÇÃO EM BATELADAS

Como forma de fermentação utilizando microorganismo, a maior parte da fermentação em bateladas típica foi conduzida para avaliar a sua produtividade de ácido L-láctico. Foi conduzido teste de fermentação em bateladas, em que foi utilizado o meio de fermentação de ácido láctico exibido na Tabela 1 e foi utilizado o tanque de reação 1 somente do aparelho de fermentação contínua do tipo de separação de membrana da Fig. 1. O meio foi utilizado após esterilização a vapor em alta pressão (121 °C, quinze minutos). A levedura SW-1 criada no Exemplo de Referência 1 também foi utilizada como microorganismo neste exemplo comparativo, a concentração de ácido L-láctico na forma de produto foi avaliada por meio de HPLC exibida no Exemplo de Referência 1 e a concentração de glicose foi medida com Teste de Glicose Wako C (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). As condições de operação do Exemplo Comparativo 2 são as seguintes:

Capacidade do tanque de reação (quantidade do meio de fermentação de ácido láctico): 1 (L)

Controle de temperatura: 30 (°C)

Aeração do tanque de reação: 0.05 (l/min)

Velocidade de agitação do tanque de reação: 100 (rpm)

Ajuste de pH: ajustado em pH 5 com 1 N NaOH

Em primeiro lugar, a linhagem de SW-1 foi cultivada com agitação por uma noite em 5 ml de meio de fermentação de ácido láctico em tubo de ensaio (cultivo prévio preliminar). O cultivo prévio preliminar foi inoculado em

100 ml de meio de fermentação de ácido láctico novo e cultivado com agitação por 24 horas em frasco Sakaguchi de 500 ml (cultivo prévio). O cultivo prévio foi inoculado em 1,5 l de meio de fermentação de ácido láctico em aparelho de fermentação contínua do tipo de separação de membrana, tanque de reação 1
 5 foi agitado a 100 rpm com agitador 5 a ele fixado e o tanque de reação 1 foi aerado. Foram conduzidos ajuste de temperatura e ajuste de pH e, sem operar bomba de circulação de líquido de fermentação 10, foi conduzido cultivo de fermentação em bateladas. A quantidade dos microorganismos cultivados neste cultivo foi de 14 em termos de absorção a 600 nm. Os resultados de
 10 fermentação em bateladas são exibidos na Tabela 2.

TABELA 2

	Ex. Comparativo 1	Ex. 1	Ex. 2	Ex. 3	Ex. 4	Ex. 5	Ex. 6
Tempo de fermentação (h)	72	300	300	300	300	300	300
Glicose total introduzida (g)	100	2620	2720	2750	2120	2070	2110
Ácido L-láctico total produzido (g)	26	1580	1525	1540	1350	1305	1350
Glicose não utilizada (g)	0	60	75	90	40	30	35
Rendimento de Ácido L-láctico com relação a açúcar (g/g)	0,26	0,62	0,58	0,58	0,65	0,64	0,65
Velocidade de produção de ácido L-láctico (g/l/h)	0,36	2,6	2,5	2,5	3,0	2,9	3,0

A velocidade de produção de ácido L-láctico foi significativamente aprimorada pelo método de fabricação de produto químico de acordo com a

presente invenção utilizando o aparelho de fermentação exibido nas Figs. 1 e 2.

EXEMPLO COMPARATIVO 2

PRODUÇÃO DE ÁCIDO L-LÁCTICO POR MEIO DE FERMENTAÇÃO CONTÍNUA

UTILIZANDO LEVEDURA

5 Fermentação contínua foi conduzida da mesma forma que no Exemplo 1, exceto pelo fato de que a membrana porosa que possui pequeno diâmetro de poro e baixo coeficiente de permeabilidade a água purificada, preparada no Exemplo de Referência 5, foi utilizada como membrana de separação e a quantidade de água que penetrou através da membrana foi
10 regulada por meio de regulação da velocidade de fluxo com diferença de pressão transmembrana (regulada na faixa de 0,1 ou mais a 20 kPa ou menos em todo o período de fermentação contínua).

Como resultado, a diferença de pressão transmembrana excedeu 20 kPa em 96 horas após o início do cultivo, para causar a obstrução da
15 membrana e, desta forma, foi suspensa a fermentação contínua. Conseqüentemente, revelou-se que a membrana porosa preparada no Exemplo de Referência 5 não é apropriada para a produção de ácido L-láctico.

EXEMPLO COMPARATIVO 3

PRODUÇÃO DE ÁCIDO L-LÁCTICO POR MEIO DE FERMENTAÇÃO CONTÍNUA

UTILIZANDO LEVEDURA

20 Fermentação contínua foi conduzida da mesma forma que no Exemplo 4, exceto pelo fato de que a membrana porosa que possui pequeno diâmetro de poro e baixo coeficiente de permeabilidade a água purificada, preparada no Exemplo de Referência 5, foi utilizada como membrana de
25 separação e a quantidade de água que penetrou através da membrana foi regulada por meio de regulação da velocidade de fluxo com diferença de pressão transmembrana (regulada na faixa de 0,1 ou mais a 20 kPa ou menos em todo o período de fermentação contínua).

Como resultado, a diferença de pressão transmembrana excedeu 20 kPa em 80 horas após o início do cultivo, para causar a obstrução da membrana e, desta forma, foi suspensa a fermentação contínua. Conseqüentemente, revelou-se que a membrana porosa preparada no Exemplo de Referência 5 não é apropriada para a produção de ácido L-láctico.

EXEMPLO 7

PRODUÇÃO DE ETANOL POR MEIO DE FERMENTAÇÃO CONTÍNUA (Nº 1)

A produção de etanol foi conduzida utilizando o aparelho de fermentação contínua do tipo separação de membrana da Fig. 1 e meio de fermentação de etanol que possui a composição exibida na Tabela 3. O meio foi utilizado após esterilização a vapor em alta pressão (121 °C, quinze minutos). Como membrana de separação, foi utilizada a membrana porosa preparada no Exemplo de Referência 2. A menos que indicado em contrário, as condições de operação deste exemplo são as seguintes:

Capacidade de tanque de reação: 2 (L)
 Capacidade do tanque de separação de membrana: 0,5 (L)
 Membrana de separação utilizada: membrana de filtração de fluoreto de polivinilideno

Área de filtração eficaz do elemento de separação de membrana:
 120 cm²

Controle de temperatura: 30 (°C)
 Aeração do tanque de reação: 0.05 (l/min)
 Aeração do tanque de separação de membrana: 0.3 (l/min)
 Velocidade de agitação do tanque de reação: 100 (rpm)
 Ajuste de pH: ajustado em pH 5 com 1 N NaOH
 Velocidade de alimentação do meio de fermentação de etanol: controle variável na faixa de 50 a 300 ml/h.

Quantidade de líquido em circulação com aparelho de circulação

de líquido de fermentação: 0,1 (l/min)

Regulagem da quantidade de água de permeação da membrana:
regulagem da velocidade de fluxo por diferença de pressão transmembrana

(do início da fermentação contínua até 100 horas: regulada em

5 0,1 kPa ou mais a 5 kPa ou menos;

- 100 horas a 200 horas: regulada em 0,1 kPa ou mais a 2
kPa ou menos; e

- 200 horas a 300 horas: regulada em 0,1 kPa ou mais a 20
kPa ou menos).

10 Linhagem NBRC10505 foi utilizada como microorganismo, meio
de fermentação de etanol que possui a composição exibida na Tabela 1 foi
utilizado como meio e a concentração de etanol como produto foi quantificada
por meio de cromatografia de gás para avaliação. Em cromatografia de gás,
utilizou-se Shimadzu GC-2010 capilar GC TC-1 (GL Science) 15 metros de
15 comprimento x 0,53 mm de diâmetro interno, df 1,5 µm, e detector de chama de
hidrogênio (FID) na detecção e cálculo. A concentração de glicose foi medida
com Teste de Glicose Wako C (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.).

TABELA 3

MEIO DE FERMENTAÇÃO DE ETANOL

Glicose	100 g
Base de nitrogênio de levedura sem aminoácido (Difco)	6,7 g
Padrão 19 aminoácidos excluindo leucina	78 mg
Leucina	380 mg
Inositol	76 mg
Ácido p-aminobenzóico	8 mg
Adenina	40 mg
Uracil	76 mg

Unidade (1/litro)

Em primeiro lugar, a linhagem de NBRC10505 foi cultivada com agitação por uma noite em 5 ml de meio de fermentação de etanol em tubo de ensaio (antes do cultivo prévio preliminar). O cultivo resultante foi inoculado em 100 ml de meio de fermentação de etanol novo e cultivado com agitação por 24 horas a 30 °C em frasco Sakaguchi de 500 ml (cultivo prévio preliminar). O cultivo prévio preliminar foi inoculado em 1,5 l de meio de fermentação de etanol no aparelho de fermentação contínua do tipo de separação de membrana exibido na Fig. 1, tanque de reação 1 foi agitado a 100 rpm com agitador 5 a ele fixado, seguido pela regulagem de aeração, controle de temperatura e ajuste de pH do tanque de reação 1 e, sem operar bomba de circulação de líquido de fermentação 10, o microorganismo foi cultivado por 24 horas (cultivo prévio). Imediatamente após o término do cultivo prévio, a bomba de circulação de líquido de fermentação 10 foi operada e o microorganismo foi cultivado continuamente sob as condições em que, além das condições de operação no momento do cultivo prévio, tanque de separação de membrana 2 foi aerado, meio de fermentação de etanol foi alimentado continuamente e a quantidade de água de permeação de membrana foi regulada de tal forma que a quantidade do líquido de fermentação no aparelho de fermentação contínua do tipo separação de membrana tornou-se 2 L, por meio do quê etanol foi produzido por fermentação contínua. Neste teste de fermentação contínua, a quantidade de água de permeação de membrana foi regulada e alterada sob as condições de controle de água de permeação de membrana descritas acima, durante o quê a diferença de cabeça d'água foi medida como a diferença de pressão transmembrana com aparelho de regulagem de diferença de cabeça d'água 3. A concentração de etanol produzida no líquido de fermentação de permeação de membrana e a concentração de glicose residual foram medidas em momento apropriado. Os resultados são exibidos na Tabela 4.

A produção estável de etanol por meio de fermentação contínua

do tipo separação de membrana foi viável por meio do método de fabricação de produto químico de acordo com a presente invenção utilizando o aparelho de fermentação contínua da Fig. 1. A diferença de pressão transmembrana variou dentro de 2 kPa em todo o período de fermentação contínua.

5

EXEMPLO 8

PRODUÇÃO DE ETANOL POR MEIO DE FERMENTAÇÃO CONTÍNUA (Nº 2)

A produção de etanol foi conduzida utilizando o aparelho de fermentação contínua da Fig. 2 e meio de fermentação de etanol que possui a composição exibida na Tabela 3. O meio foi utilizado após esterilização a vapor em alta pressão (121 °C, quinze minutos). Como material de elemento de membrana de separação, utilizou-se moldagem de resina de polissulfona e aço inoxidável. Como membrana de separação, foi utilizada a membrana porosa preparada no Exemplo de Referência 2. A menos que indicado em contrário, as condições de operação deste exemplo são as seguintes:

15

Capacidade de tanque de reação: 2 (L)

Membrana de separação utilizada: membrana de filtragem de fluoreto de polivinilideno

Área de filtragem eficaz do elemento de separação de membrana: 120 cm²

20

Controle de temperatura: 30 (°C)

Aeração do tanque de reação de fermentação: 0,05 (l/min)

Velocidade de alimentação do meio de fermentação de ácido láctico: controle variável na faixa de 50 a 300 ml/h.

25 (rpm)

Velocidade de agitação do tanque de reação de fermentação: 800

Ajuste de pH: ajustado em pH 5 com 1 N NaOH

Regulagem da quantidade de água de permeação da membrana: regulagem da velocidade de fluxo por diferença de pressão transmembrana

(do início da fermentação contínua até 80 horas: regulada em 0,1 kPa ou mais a 5 kPa ou menos;

- 80 horas a 160 horas: regulada em 0,1 kPa ou mais a 2 kPa ou menos; e

5 - 160 horas a 240 horas: regulada em 0,1 kPa ou mais a 20 kPa ou menos).

Esterilização: o tanque de cultivo, incluindo o elemento de membrana de separação, e o meio utilizado, foram esterilizados com vapor sob alta pressão em autoclave a 121 °C por vinte minutos.

10 Levedura NBRC10505 foi utilizada como microorganismo, meio de fermentação de etanol que possui a composição exibida na Tabela 2 foi utilizado como meio, a concentração de etanol na forma de produto foi avaliada por meio de cromatografia de gás exibida no Exemplo 7 e a concentração de glicose foi medida com Teste de Glicose Wako C (Wako Pure Chemical
15 Industries, Ltd.).

Em primeiro lugar, a linhagem NBRC10505 foi cultivada com agitação por uma noite em 5 ml de meio de fermentação de etanol em tubo de ensaio (antes do cultivo prévio preliminar). O cultivo resultante foi inoculado em 100 ml de meio de fermentação de etanol novo e cultivado com agitação por 24
20 horas a 30 °C em frasco Sakaguchi de 500 ml (cultivo prévio preliminar). O cultivo prévio preliminar foi inoculado em 1,5 l de meio de fermentação de etanol no aparelho de fermentação contínua do tipo de separação de membrana exibido na Fig. 2, tanque de reação 1 foi agitado a 400 rpm com agitador 5 a ele fixado, seguido pela regulação de aeração, controle de
25 temperatura e ajuste de pH do tanque de reação 1 e o microorganismo foi cultivado por 24 horas (cultivo prévio). Imediatamente após o término do cultivo prévio, o microorganismo foi cultivado continuamente em meio de fermentação de etanol alimentado continuamente e com a quantidade de água de

permeação de membrana regulada de tal forma que a quantidade do líquido de fermentação no aparelho de fermentação contínua do tipo de separação de membrana tornou-se 1,5 l, por meio do quê foi produzido etanol por fermentação contínua. Neste teste de fermentação contínua, a quantidade de
5 água de permeação de membrana foi regulada e alterada sob as condições de controle de água de permeação de membrana descritas acima, durante o quê a diferença de cabeça d'água foi medida como a diferença de pressão transmembrana com aparelho de regulação de diferença de cabeça d'água 3. A concentração de etanol produzida no líquido de fermentação de permeação
10 de membrana e a concentração de glicose residual foram medidas em momento apropriado. O rendimento de etanol em açúcar e a velocidade de produção de etanol calculada a partir do etanol e glicose introduzida calculada a partir da concentração de glicose são exibidos na Tabela 4.

A produção estável de etanol por meio de fermentação contínua
15 foi viável por meio do método de fabricação de produto químico de acordo com a presente invenção utilizando o aparelho de fermentação contínua da Fig. 2. A diferença de pressão transmembrana variou dentro de 2 kPa em todo o período de fermentação contínua.

EXEMPLO COMPARATIVO 4

PRODUÇÃO DE ETANOL POR MEIO DE FERMENTAÇÃO EM BATELADAS

Como forma de fermentação utilizando microorganismo, a maior parte da fermentação em bateladas típica foi conduzida para avaliar a sua produtividade de etanol. Foi conduzido teste de fermentação em bateladas, em que foi utilizado o meio de fermentação de etanol exibido na Tabela 3 e o
25 tanque de reação 1 somente do aparelho de fermentação contínua do tipo de separação de membrana da Fig. 1. O meio foi utilizado após esterilização a vapor em alta pressão (121 °C, quinze minutos). Levedura NBRC10505 também foi utilizada como microorganismo neste exemplo comparativo, a

concentração de etanol na forma de produto foi avaliada por meio de cromatografia de gás exibida no Exemplo 6 e a concentração de glicose foi medida com Teste de Glicose Wako C (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). As condições de operação deste exemplo comparativo são as seguintes:

5 Capacidade do tanque de reação (quantidade do meio de fermentação de etanol): 1 (L)

Controle de temperatura: 30 (°C)

Aeração do tanque de reação: 0,05 (l/min)

Velocidade de agitação do tanque de reação: 100 (rpm)

10 Ajuste de pH: ajustado em pH 5 com 1 N NaOH

Em primeiro lugar, a linhagem NBRC10505 foi cultivada com agitação por uma noite em 5 ml de meio de fermentação de etanol em tubo de ensaio (cultivo prévio preliminar). O cultivo prévio preliminar foi inoculado em 100 ml de meio de fermentação de etanol novo e cultivado com agitação por 24
15 horas em frasco Sakaguchi de 500 ml (cultivo prévio). O cultivo prévio foi inoculado em 1,5 l de meio de fermentação de etanol no aparelho de fermentação contínuo do tipo de separação de membrana, tanque de reação 1 foi agitado a 100 rpm com agitador 5 a ele fixado e o tanque de reação 1 foi aerado. Foram conduzidos ajuste de temperatura e ajuste de pH e, sem operar
20 bomba de circulação de líquido de fermentação 10, foi conduzido cultivo de fermentação em bateladas. A quantidade dos microorganismos cultivados neste cultivo foi de 18 em termos de absorção a 600 nm. Os resultados de fermentação em bateladas são exibidos na Tabela 4.

TABELA 4

	Exemplo Comparativo 4	Exemplo 7	Exemplo 8
Tempo de fermentação (h)	28	300	300
Glicose total introduzida (g)	100	6320	4750

	Exemplo Comparativo 4	Exemplo 7	Exemplo 8
Total de etanol produzido (g)	47	2900	2120
Glicose não utilizada (g)	0	50	35
Rendimento de etanol com relação a açúcar (g/g)	0.47	0.46	0.45
Velocidade de produção de etanol (g/l/h)	1.7	4.8	4.7

A velocidade de produção de etanol foi significativamente aprimorada pelo método de fabricação de produto químico de acordo com a presente invenção utilizando o aparelho de fermentação exibido nas Figs. 1 e 2.

5

EXEMPLO 9

PRODUÇÃO DE ÁCIDO PIRÚVICO POR MEIO DE FERMENTAÇÃO CONTÍNUA (Nº 1)

A produção de ácido pirúvico foi conduzida utilizando o aparelho de fermentação contínua do tipo separação de membrana da Fig. 1 e meio de fermentação de ácido pirúvico que possui a composição exibida na Tabela 5. O
10 meio foi utilizado após esterilização a vapor em alta pressão (121 °C, quinze minutos). Como membrana de separação, foi utilizada a membrana porosa preparada no Exemplo de Referência 2. A menos que indicado em contrário, as condições de operação deste exemplo são as seguintes:

Capacidade do tanque de reação de fermentação: 2 (L)

15

Membrana de separação utilizada: membrana de filtração de fluoreto de polivinilideno

Área de filtração eficaz do elemento de separação de membrana:
120 cm²

Controle de temperatura: 30 (°C)

Aeração do tanque de reação de fermentação: 1,5 (l/min)

Velocidade de agitação do tanque de reação de fermentação: 800 (rpm)

Ajuste de pH: ajustado em pH 5,5 com 4 N NaOH

5 Esterilização: o tanque de cultivo, incluindo o elemento de membrana de separação, e o meio utilizado, foram esterilizados sob alta pressão em autoclave a 121 °C por vinte minutos.

Regulagem da quantidade de água de permeação da membrana: regulagem da velocidade de fluxo por diferença de pressão transmembrana

10 (do início da fermentação contínua até 100 horas: regulada em 0,1 kPa ou mais a 5 kPa ou menos;

- 100 horas a 180 horas: regulada em 0,1 kPa ou mais a 2 kPa ou menos; e

- 180 horas a 264 horas: regulada em 0,1 kPa ou mais a 20 kPa ou menos).

15 Linhagem P120-5a de *Torulopsis glabrata* (FERM P-16745) foi utilizada como microorganismo, meio de fermentação de ácido pirúvico que possui a composição exibida na Tabela 5 foi utilizado como meio e a concentração de ácido pirúvico como produto foi avaliada por meio de HPLC sob as condições a seguir:

Coluna: Shim-Pack SPR-H (fabricada pela Shimadzu Corporation)

Fase móvel: 5 mM de ácido p-toluenossulfônico (velocidade de fluxo de 0,8 ml/min)

25 Solução de reação: 5 mM de ácido p-toluenossulfônico, 20 mM de Bis-Tris, 0,1 mM de EDTA·2Na Na (velocidade de fluxo de 0,8 ml/min)

Método de detecção: condutividade elétrica

Temperatura: 45 °C

A concentração de glicose foi medida com Teste de Glicose Wako

C (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.).

TABELA 5

MEIO DE FERMENTAÇÃO DE ÁCIDO PIRÚVICO

Glicose	100 g/l
Sulfato de amônio	5 g/l
Di-hidrogênio fosfato de potássio	1 g/l
Sulfato de magnésio 7H ₂ O	0,5 g/L
Hidrolisados de soja	2 g/l
Ácido nicotínico	8 mg/l
Cloridrato de piridoxina	1 mg/l
Biotina	0,05 mg/l
Cloridrato de tiamina	0,05 mg/l
pH 5,5	

Em primeiro lugar, a linhagem de P120-5a foi cultivada com
 5 agitação por uma noite em 5 ml de meio de fermentação de ácido pirúvico em
 tubo de ensaio (antes do cultivo prévio preliminar). O cultivo resultante foi
 inoculado em 100 ml de meio de fermentação de ácido pirúvico novo e
 cultivado com agitação por 24 horas a 30 °C em frasco Sakaguchi de 500 ml
 (cultivo prévio preliminar). O cultivo prévio preliminar foi inoculado em 1,5 l de
 10 meio de fermentação de ácido pirúvico no aparelho de fermentação contínua
 do tipo de separação de membrana exibido na Fig. 1, tanque de reação de
 fermentação 1 foi agitado a 800 rpm com agitador 5 a ele fixado, seguido pela
 regulação de aeração, controle de temperatura e ajuste de pH do tanque de
 reação de fermentação 1 e o microorganismo foi cultivado por 24 horas (cultivo
 15 prévio). Imediatamente após o término do cultivo prévio, a bomba de circulação
 de líquido de fermentação 10 foi operada e o microorganismo foi cultivado
 continuamente sob as condições em que, além das condições de operação no

momento do cultivo prévio, tanque de separação de membrana 2 foi aerado, meio de fermentação de ácido pirúvico foi alimentado continuamente e a quantidade de água de permeação de membrana foi regulada de tal forma que a quantidade do líquido de fermentação no aparelho de fermentação contínua do tipo separação de membrana tornou-se 2 L, por meio do quê ácido pirúvico foi produzido por meio de fermentação contínua. Neste teste de fermentação contínua, a quantidade de água de permeação de membrana foi regulada e alterada sob as condições de controle de água de permeação de membrana descritas acima, durante o quê a diferença de cabeça d'água foi medida como a diferença de pressão transmembrana com aparelho de regulação de diferença de cabeça d'água 3. A concentração de ácido pirúvico produzida no líquido de fermentação de permeação de membrana e a concentração de glicose residual foram medidas em momento apropriado. Os resultados no teste de fermentação contínua por trezentas horas são exibidos na Tabela 6.

A produção estável de ácido pirúvico por meio de fermentação contínua estável foi viável por meio do método de fabricação de produto químico de acordo com a presente invenção utilizando o aparelho de fermentação contínua do tipo de separação de membrana da Fig. 1. A diferença de pressão transmembrana variou dentro de 2 kPa em todo o período de fermentação contínua.

EXEMPLO 10

PRODUÇÃO DE ÁCIDO PIRÚVICO POR MEIO DE FERMENTAÇÃO CONTÍNUA (Nº 2)

A produção de ácido pirúvico foi conduzida utilizando o aparelho de fermentação contínua da Fig. 2 e meio de fermentação de ácido pirúvico que possui a composição exibida na Tabela 5. O meio foi utilizado após esterilização a vapor em alta pressão (121 °C, quinze minutos). Como material de elemento de membrana de separação, utilizou-se moldagem de resina de polissulfona e aço inoxidável. Como membrana de separação, foi utilizada a

membrana porosa preparada no Exemplo de Referência 2. A menos que indicado em contrário, as condições de operação deste exemplo são as seguintes:

Capacidade de tanque de reação: 2 (L)

5 Membrana de separação utilizada: membrana de filtração de fluoreto de polivinilideno

Área de filtração eficaz do elemento de separação de membrana: 120 cm²

Controle de temperatura: 30 (°C)

10 Aeração do tanque de reação de fermentação: 1 (l/min)

Velocidade de alimentação do meio de fermentação de ácido láctico: controle variável na faixa de 50 a 300 ml/h.

Velocidade de agitação do tanque de reação de fermentação: 800 (rpm)

15 Ajuste de pH: ajustado em pH 5,5 com 4 N NaOH

Regulagem da quantidade de água de permeação da membrana: regulagem da velocidade de fluxo por diferença de pressão transmembrana (do início da fermentação contínua até 100 horas: regulada em 0,1 kPa ou mais a 5 kPa ou menos;

20 - 100 horas a 180 horas: regulada em 0,1 kPa ou mais a 2 kPa ou menos; e

- 180 horas a 264 horas: regulada em 0,1 kPa ou mais a 20 kPa ou menos).

25 Esterilização: o tanque de cultivo, incluindo o elemento de membrana de separação, e o meio utilizado, foram esterilizados com vapor sob alta pressão em autoclave a 121 °C por vinte minutos.

Linhagem de *Torulopsis glabrata* P120-5a (FERM P-16745) foi utilizada como microorganismo, meio de fermentação de ácido pirúvico que

possui a composição exibida na Tabela 5 foi utilizado como meio e a concentração de ácido pirúvico como produto foi avaliada por meio de HPLC sob as condições a seguir:

Em primeiro lugar, a linhagem de P120-5a foi cultivada com
5 agitação por uma noite em 5 ml de meio de fermentação de ácido pirúvico em tubo de ensaio (antes do cultivo prévio preliminar). O cultivo resultante foi inoculado em 100 ml de meio de fermentação de ácido pirúvico novo e cultivado com agitação por 24 horas a 30 °C em frasco Sakaguchi de 500 ml (cultivo prévio preliminar). O cultivo prévio preliminar foi inoculado em 1,5 l de
10 meio de fermentação de ácido láctico no aparelho de fermentação contínua do tipo de separação de membrana exibido na Fig. 2, tanque de reação 1 foi agitado a 800 rpm com agitador 5 a ele fixado, seguido pela regulação de aeração, controle de temperatura e ajuste de pH do tanque de reação 1 e o microorganismo foi cultivado por 24 horas (cultivo prévio). Imediatamente após
15 o término do cultivo prévio, meio de fermentação de ácido pirúvico foi alimentado continuamente e o microorganismo foi cultivado continuamente com a quantidade de água de permeação de membrana regulada de tal forma que a quantidade do líquido de fermentação no aparelho de fermentação contínua do tipo de separação de membrana tornou-se 1,5 l, por meio do quê foi produzido
20 ácido pirúvico por meio de fermentação contínua. Neste teste de fermentação contínua, a quantidade de água de permeação de membrana foi regulada e alterada sob as condições de controle de água de permeação de membrana descritas acima, durante o quê a diferença de cabeça d'água foi medida como a diferença de pressão transmembrana com aparelho de regulação de
25 diferença de cabeça d'água 3. A concentração de ácido pirúvico produzida no líquido de fermentação de permeação de membrana e a concentração de glicose residual foram medidas em momento apropriado. O rendimento de ácido láctico com relação a açúcar e a velocidade de produção de ácido láctico

calculada a partir do ácido pirúvico e glicose introduzida calculada a partir da concentração de glicose são exibidos na Tabela 6.

Como resultado do teste de fermentação por 300 horas, produção estável de ácido pirúvico por meio de fermentação contínua foi viável por meio do método de fabricação de produto químico de acordo com a presente invenção utilizando o aparelho de fermentação contínua da Fig. 2. A diferença de pressão transmembrana variou dentro de 2 kPa em todo o período de fermentação contínua.

EXEMPLO 11

PRODUÇÃO DE ÁCIDO PIRÚVICO POR MEIO DE FERMENTAÇÃO CONTÍNUA (Nº 3)

Foi utilizado o aparelho de fermentação contínua do tipo separação de membrana da Fig. 1, linhagem NBRC0005 foi utilizada como microorganismo e todas as demais condições foram idênticas ao Exemplo 9. Os resultados de fermentação contínua são exibidos na Tabela 6. Como resultado do teste de fermentação por 300 horas, produção estável de ácido pirúvico por fermentação contínua foi viável por meio do método de fabricação de produto químico de acordo com a presente invenção utilizando o aparelho de fermentação contínua do tipo de separação de membrana da Fig. 1. A diferença de pressão transmembrana variou dentro de 2 kPa em todo o período de fermentação contínua.

EXEMPLO 12

PRODUÇÃO DE ÁCIDO PIRÚVICO POR MEIO DE FERMENTAÇÃO CONTÍNUA (Nº 4)

Foi utilizado o aparelho de fermentação contínua da Fig. 2, linhagem NBRC0005 foi utilizada como microorganismo e todas as demais condições foram idênticas ao Exemplo 10. Os resultados de fermentação contínua são exibidos na Tabela 6. Como resultado do teste de fermentação por 300 horas, produção estável de ácido pirúvico por fermentação contínua foi viável por meio do método de fabricação de produto químico de acordo com a

presente invenção utilizando o aparelho de fermentação contínua da Fig. 2. A diferença de pressão transmembrana variou dentro de 2 kPa em todo o período de fermentação contínua.

EXEMPLO COMPARATIVO 5

5 PRODUÇÃO DE ÁCIDO PIRÚVICO POR MEIO DE FERMENTAÇÃO EM BATELADAS (Nº 1)

Como forma de fermentação utilizando microorganismo, a maior parte da fermentação em bateladas típica foi conduzida em fermentador de jarra de dois litros para avaliar a sua produtividade de ácido pirúvico. Como meio, foi utilizado o meio exibido na Tabela 5 após esterilização a vapor em
10 alta pressão (121 °C, quinze minutos). Linhagem P120-5a foi utilizada como microorganismo neste exemplo comparativo, a concentração de ácido pirúvico na forma de produto foi avaliada por meio de HPLC exibida no Exemplo 9 e a concentração de glicose foi medida com Teste de Glicose Wako C (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). As condições de operação deste exemplo
15 comparativo são as seguintes:

Capacidade do tanque de reação de fermentação (quantidade do meio de fermentação de ácido pirúvico): 1 (L)

Controle de temperatura: 30 (°C)

Aeração do tanque de reação de fermentação: 1 (l/min)

20 Velocidade de agitação do tanque de reação de fermentação: 600 (rpm)

Ajuste de pH: ajustado em pH 5,5 com 4 N NaOH

Em primeiro lugar, a linhagem P120-5a foi cultivada com agitação por uma noite em 5 ml de meio de fermentação de ácido pirúvico em tubo de
25 ensaio (cultivo prévio preliminar). O cultivo prévio preliminar foi inoculado em 50 ml de meio de fermentação de ácido pirúvico novo e cultivado com agitação por 24 horas em frasco Sakaguchi de 500 ml (cultivo prévio). O cultivo prévio foi inoculado em um litro de meio de fermentação de ácido pirúvico em

fermentador de jarra e submetido a fermentação em bateladas. Os resultados de fermentação em bateladas são exibidos na Tabela 6.

EXEMPLO COMPARATIVO 6

PRODUÇÃO DE ÁCIDO PIRÚVICO POR MEIO DE FERMENTAÇÃO EM BATELADAS (Nº 2)

- 5 Como forma de fermentação utilizando microorganismo, a maior parte da fermentação em bateladas típica foi conduzida em fermentador de jarra de dois litros para avaliar a sua produtividade de ácido pirúvico. Neste exemplo comparativo, linhagem NBRC0005 foi utilizada como microorganismo e todas as demais condições foram idênticas ao Exemplo Comparativo 3. Os
- 10 resultados de fermentação em bateladas são exibidos na Tabela 6.

TABELA 6

	Ex. Comparativo 3	Ex. 9	Ex. 10	Ex. Comparativo 4	Ex. 11	Ex. 12
Tempo de fermentação (h)	72	264	264	45	264	264
Glicose total introduzida (g)	100	3410	2806	100	3440	2660
Total de piruvato de sódio produzido (g)	70	1790	1237	58	1580	1110
Glicose não utilizada (g)	0	320	419	0		190
Rendimento de piruvato de sódio com relação a açúcar (g/g)	0,70	0,58	0,52	0,58	0,49	0,45
Velocidade de produção de piruvato de sódio (g/l/h)	1,0	3,4	3,1	1,28	3,0	2,8

A velocidade de produção de ácido pirúvico foi significativamente aprimorada pelo método de fabricação de produto químico de acordo com a presente invenção utilizando o aparelho de fermentação exibido nas Figs. 1 e

15 2.

EXEMPLO 13

PRODUÇÃO DE ÁCIDO SUCCÍNICO POR MEIO DE FERMENTAÇÃO CONTÍNUA (Nº 1)

A produção de ácido succínico foi conduzida utilizando o aparelho de fermentação contínua do tipo separação de membrana da Fig. 1.

A menos que indicado em contrário, ácido succínico e glicose na produção de ácido succínico foram medidos por meio do método a seguir.

- 5 Ácido succínico em sobrenadante centrifugado de cultivo foi analisado por meio de HPLC (Shimadzu LC10A, monitor de RI: RID-10A, coluna: Aminex HPX-87H). A temperatura da coluna era de 50 °C, a coluna foi equilibrada com 0, 01 N H₂SO₄ e amostra foi injetada em seguida na coluna e analisada por meio de eluição com 0, 01 H₂SO₄. Glicose foi medida por sensor de glicose (BF-4, Oji Scientific Instruments).

O meio foi utilizado após esterilização a vapor em alta pressão (121 °C, quinze minutos). Como membrana de separação, foi utilizada a membrana porosa preparada no Exemplo de Referência 2. A menos que indicado em contrário, as condições de operação deste exemplo são as seguintes:

- 15 Capacidade de tanque de reação: 2 (L)
Capacidade do tanque de separação de membrana: 0,5 (L)
Membrana de separação utilizada: membrana de filtração de fluoreto de polivinilideno
Área de filtração eficaz do elemento de separação de membrana:
20 60 cm²
Controle de temperatura: 39 (°C)
Aeração de CO₂ do tanque de reação: 10 (ml/min)
Aeração de CO₂ do tanque de separação de membrana: 1 00 (ml/min)
25 Velocidade de agitação do tanque de reação: 100 (rpm)
Ajuste de pH: ajustado em pH 6,4 com 2 M Na₂CO₃
Velocidade de alimentação do meio de fermentação de ácido láctico: controle variável na faixa de 50 a 300 ml/h.

Quantidade de líquido em circulação com aparelho de circulação de líquido de fermentação: 0,1 (l/min)

Regulagem da quantidade de água de permeação da membrana: regulagem da velocidade de fluxo por diferença de pressão transmembrana

5 (do início da fermentação contínua até 100 horas: regulada em 0,1 kPa ou mais a 5 kPa ou menos;

- 100 horas a 200 horas: regulada em 0,1 kPa ou mais a 2 kPa ou menos; e

- 200 horas a 264 horas: regulada em 0,1 kPa ou mais a 20 kPa ou menos).

Neste exemplo, foi conduzida a produção contínua de ácido succínico por *Anaerobiospirillum succiniciproducens* ATCC 53488 como microorganismo que possui capacidade de produção de ácido succínico. 100 ml de meio de cultivo de semente que consiste de 20 g/l de glicose, 10 g/l de polipeptona, 5 g/l de extrato de levedura, 3g/l de K_2HPO_4 , 1 g/l de NaCl, 1 g/L de $(NH_4)_2SO_4$, 0,2 g/l de $MgCl_2$ e 0,2 g/l de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ foram introduzidos em frasco Erlenmeyer de 125 ml e esterilizados por meio de aquecimento. Em porta-luvas anaeróbico, adicionou-se 1 ml de 30 mM Na_2CO_3 e 0,15 ml of 180 mM H_2SO_4 e foram adicionalmente agregados 0,5 ml de solução reduzida que consiste de 0,25 g/l de cisteína-HCl e 0,25 g/L de Na_2S . Em seguida, linhagem ATCC53488 foi inoculada no meio e mantida em cultivo estacionário a 39 °C por uma noite (cultivo prévio preliminar). 5 ml de solução reduzida que consiste de 0,25 g/l de cisteína-HCl e 0,25 g/l de $Na_2S \cdot 9H_2O$ foram adicionados a 1,5 l de meio de fermentação de ácido succínico (Tabela 7) no aparelho de fermentação contínua do tipo separação de membrana exibido na Fig. 1 e 50 ml do cultivo prévio preliminar foram inoculados. Tanque de reação de fermentação 1 foi agitado a 200 rpm com agitador 5 a ele fixado, seguido pela regulagem de aeração de CO_2 , controle de temperatura e ajuste de pH do

tanque de reação de fermentação 1 e o microorganismo foi cultivado por 24 horas (cultivo prévio).

TABELA 7

MEIO DE FERMENTAÇÃO DE ÁCIDO SUCCÍNICO

Meio para <i>Actinobacillus</i> <i>succinogenes</i>		
Glicose	100,0	g/l
NaCl	1,0	g/l
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,2	g/l
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	1,2	g/l
Na ₂ HPO ₄	0,3	g/l
K ₂ HPO ₂	-	g/l
MgCl ₂ · 6H ₂ O	0,2	g/l
Vitamina B ₁₂	10	µg/l
Biotina	200	µg/l
Ácido fólico	200	µg/l
Tiamina · HCl	500	µg/l
Riboflavina	500	µg/l
Niacina	500	µg/l
Ácido pantotênico	500	µg/l
Ácido p-aminobenzóico	500	µg/l
Vitamina B ₆	1	µg/l
Extrato de levedura	5,0	g/l
Líquido de maceração de milho	10,0	g/l
Polipeptona	-	g/l
NH ₄ Cl	-	g/l
FeSO ₄ · 7H ₂ O	-	g/l

Imediatamente após o término do cultivo prévio, meio de fermentação de ácido succínico foi alimentado continuamente e o microorganismo foi cultivado continuamente enquanto a quantidade de água de permeação de membrana foi regulada de tal forma que a quantidade do líquido de fermentação no aparelho de fermentação contínua do tipo de separação de membrana tornou-se 2 l, por meio do quê foi produzido ácido succínico por fermentação contínua. A quantidade de água de permeação de membrana no teste de fermentação contínua foi regulada por meio de alteração adequada da diferença de cabeça d'água, de tal forma que a diferença de cabeça d'água do tanque de reação de fermentação fosse de até 2 m, ou seja, a diferença de pressão transmembrana foi de 0,1 ou mais a 20 kPa ou menos. A concentração de ácido succínico produzida no líquido de fermentação de permeação de membrana e a concentração de glicose residual foram medidas em momento apropriado. A velocidade de produção de ácido succínico e o rendimento de ácido succínico, calculados a partir da concentração de ácido succínico e de glicose, são exibidos na Tabela 8. A diferença de pressão transmembrana variou dentro de 2 kPa em todo o período de fermentação contínua.

EXEMPLO 14

PRODUÇÃO DE ÁCIDO SUCCÍNICO POR MEIO DE FERMENTAÇÃO CONTÍNUA (Nº 2)

A produção de ácido succínico foi conduzida utilizando o aparelho de fermentação contínua da Fig. 2. O meio foi utilizado após esterilização a vapor em alta pressão (121 °C, quinze minutos). As concentrações de ácido succínico e glicose foram medidas da mesma forma que no Exemplo 13. Como membrana de separação, foi utilizada a membrana porosa preparada no Exemplo de Referência 2. A menos que indicado em contrário, as condições de operação deste exemplo são as seguintes:

Capacidade de tanque de reação: 2 (L)

Membrana de separação utilizada: membrana de filtragem de

fluoreto de polivinilideno

Área de filtragem eficaz do elemento de separação de membrana:
120 cm²

Controle de temperatura: 39 (°C)

5 Aeração de CO₂ do tanque de reação de fermentação: 10 (ml/min)

Velocidade de alimentação do meio de fermentação de ácido
lático: controle variável na faixa de 50 a 300 ml/h.

Velocidade de agitação do tanque de reação de fermentação: 600
(rpm)

10 Ajuste de pH: ajustado em pH 6,4 com 2 M Na₂CO₃

Regulagem da quantidade de água de permeação da membrana:
regulagem da velocidade de fluxo por diferença de pressão transmembrana

(do início da fermentação contínua até 80 horas: regulada em 0,1
kPa ou mais a 5 kPa ou menos;

15 - 80 horas a 160 horas: regulada em 0,1 kPa ou mais a 2
kPa ou menos; e

- 160 horas a 280 horas: regulada em 0,1 kPa ou mais a 20
kPa ou menos).

20 Esterilização: o tanque de cultivo, incluindo o elemento de
membrana de separação, e o meio utilizado, foram esterilizados com vapor sob
alta pressão em autoclave a 121 °C por vinte minutos.

Neste exemplo, foi conduzida a produção contínua de ácido
succínico por linhagem de *Anaerobiospirillum succiniciproducens* ATCC
53488 como microorganismo que possui capacidade de produção de ácido
25 succínico. 100 ml de meio de cultivo de semente que consiste de 20 g/l de
glicose, 10 g/l de polipeptona, 5 g/l de extrato de levedura, 3g/L de K₂HPO₄, 1
g/l de NaCl, 1 g/L de (NH₄)₂SO₄, 0,2 g/l de MgCl₂ e 0,2 g/l de CaCl₂·2H₂O
foram introduzidos em frasco Erlenmeyer de 125 ml e esterilizados por meio

de aquecimento. Em porta-luvas anaeróbico, adicionou-se 1 ml de 30 mM Na_2CO_3 e 0,15 ml de 180 mM H_2SO_4 e foram adicionalmente agregados 0,5 ml de solução reduzida que consiste de 0,25 g/l de cisteína-HCl e 0,25 g/L de Na_2S . Em seguida, linhagem ATCC53488 foi inoculada no meio e mantida em
5 cultivo estacionário a 39 °C por uma noite (cultivo prévio preliminar). 5 ml de solução reduzida que consiste de 0,25 g/l de cisteína-HCl e 0,25 g/l de $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ foram adicionados a 1,5 l de meio de fermentação de ácido succínico (Tabela 7) no aparelho de fermentação contínua exibido na Fig. 2 e 50 ml do cultivo prévio preliminar foram inoculados. Tanque de reação de
10 fermentação 1 foi agitado a 600 rpm com agitador 5 a ele conectado, seguido pela regulação de aeração de CO_2 , controle de temperatura e ajuste de pH do tanque de reação de fermentação 1 e o microorganismo foi cultivado por 24 horas (cultivo prévio).

Imediatamente após o término do cultivo prévio, meio de
15 fermentação de ácido succínico foi alimentado continuamente e o microorganismo foi cultivado continuamente enquanto a quantidade de água de permeação de membrana regulada de tal forma que a quantidade do líquido de fermentação no aparelho de fermentação contínua do tipo de separação de membrana tornou-se 1,5 l, por meio do quê foi produzido ácido succínico por
20 fermentação contínua. A quantidade de água de permeação de membrana no teste de fermentação contínua foi regulada por meio de alteração adequada da diferença de cabeça d'água com aparelho de regulação da diferença de cabeça d'água 3, de tal forma que a cabeça d'água do tanque de reação de fermentação fosse de até 2 m, ou seja, a diferença de pressão transmembrana
25 foi de 0,1 a 20 kPa. A concentração de ácido succínico produzida no líquido de fermentação de permeação de membrana e a concentração de glicose residual foram medidas em momento apropriado. A velocidade de produção de ácido succínico e o rendimento de ácido succínico, calculados a partir da

concentração de ácido succínico e de glicose, são exibidos na Tabela 8. A diferença de pressão transmembrana variou dentro de 2 kPa em todo o período de fermentação contínua.

EXEMPLO COMPARATIVO 7

5 PRODUÇÃO DE ÁCIDO SUCCÍNICO POR MEIO DE FERMENTAÇÃO EM BATELADAS

A produção de ácido succínico por meio de fermentação em bateladas de *Anaerobiospirillum succiniciproducens* foi conduzida conforme segue.

100 ml de meio de cultivo de semente que consiste de 20 g/l de
10 glicose, 10 g/l de polipeptona, 5 g/l de extrato de levedura, 3 g/L de K_2HPO_4 , 1
g/l de NaCl, 1 g/L de $(NH_4)_2SO_4$, 0,2 g/l de $MgCl_2$ e 0,2 g/l de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ foram
introduzidos em frasco Erlenmeyer de 125 ml e esterilizados por meio de
aquecimento. Em porta-luvas anaeróbico, adicionou-se 1 ml de 30 mM Na_2CO_3
e 0,15 ml de 180 mM H_2SO_4 e foram adicionalmente agregados 0,5 ml de
15 solução reduzida que consiste de 0,25 g/l de cisteína-HCl e 0,25 g/L de Na_2S .
Em seguida, linhagem *Anaerobiospirillum succiniciproducens* ATCC53488 foi
inoculada no meio e mantida em cultivo estacionário a 39 °C por uma noite. Um
litro de meio de fermentação exibido na Tabela 7 foi adicionado a fermentador
de mini-jarra (2 l, tipo BMJ, fabricado pela ABLE) e esterilizado por meio de
20 aquecimento (120 °C, vinte minutos).

Gás CO_2 foi introduzido sob velocidade de 10 ml/min com
aspersor, adicionou-se 10 ml de solução de 3 M Na_2CO_3 e o pH foi ajustado
em 6,8 com solução de ácido sulfúrico. Adicionou-se 5 ml de solução
reduzida que consiste de 0,25 g/l de cisteína-HCl e 0.25 g/l de $Na_2S \cdot 9H_2O$ e
25 50 ml do cultivo de semente foram inoculados no meio e cultivados sob
velocidade de agitação de 200 rpm sob temperatura de 39 °C enquanto o pH
era ajustado em 6,4 com solução de 2 M Na_2CO_3 . Os resultados são
exibidos na Tabela 8.

TABELA 8

	Exemplo Comparativo 7	Exemplo 13	Exemplo 14
Tempo de fermentação (h)	39	264	280
Glicose introduzida (g)	49	1090	1689
Ácido succínico formado (g)	38	871	1394
Glicose não utilizada (g)	1	15	29
Rendimento (g/g)	0.775	0.81	0.84
Velocidade de produção (g/l/h)	0.97	2.2	3.3

A velocidade de produção de ácido succínico foi significativamente aprimorada pelo método de fabricação de produto químico de acordo com a presente invenção utilizando o aparelho de fermentação exibido nas Figs. 1 e 2.

EXEMPLO 15**PRODUÇÃO DE ÁCIDO SUCCÍNICO POR MEIO DE FERMENTAÇÃO CONTÍNUA (Nº 3)**

A produção de ácido succínico foi conduzida utilizando o aparelho de fermentação contínua do tipo separação de membrana da Fig. 1. As concentrações de ácido succínico e glicose foram medidas da mesma forma que no Exemplo 13. O meio foi utilizado após esterilização a vapor em alta pressão (121 °C, quinze minutos). Como membrana de separação, foi utilizada a membrana porosa preparada no Exemplo de Referência 2. As condições de operação neste exemplo são idênticas ao Exemplo 13, exceto pela regulação da quantidade de água de permeação de membrana a seguir.

Regulagem da quantidade de água de permeação da membrana:
regulagem da velocidade de fluxo por diferença de pressão transmembrana

(do início da fermentação contínua até 100 horas: regulada em 0,1 kPa ou mais a 5 kPa ou menos;

- 100 horas a 200 horas: regulada em 0,1 kPa ou mais a 2 kPa ou menos; e

- 200 horas a 254 horas: regulada em 0,1 kPa ou mais a 20 kPa ou menos).

- 5 Neste exemplo, foi conduzida a produção contínua de ácido succínico por linhagem de *Anaerobiospirillum succiniciproducens* ATCC 53488 como microorganismo que possui capacidade de produção de ácido succínico. 75 mL de meio de fermentação de ácido succínico para *Actinobacillus* exibido na Tabela 9 e 4,0 g de MgCO_3 foram adicionados a tubo de ensaio de 100 ml
- 10 de soro, seguidos pela substituição do gás no tubo por CO_2 e esterilização sob aquecimento. 7,5 ml de suspensão bacteriana da linhagem ATCC55618 foram inoculados e cultivados a 37 °C por 24 horas para preparar cultivo de semente (cultivo prévio preliminar).

TABELA 9

15

MEIO DE FERMENTAÇÃO DE ÁCIDO SUCCÍNICO

	Meio para <i>Anaerobiospirillum succiniciproducens</i>	
Glicose	50,0	g/l
NaCl	-	g/l
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,2	g/l
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	-	g/l
Na_2HPO_4	-	g/l
K_2HPO_2	1,0	g/l
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,2	g/l
Vitamina B ₁₂	-	µg/l
Biotina	-	µg/l
Ácido fólico	-	µg/l

Meio para <i>Anaerobiospirillum succiniciproducens</i>		
Tiamina · HCl	-	µg/l
Riboflavina	-	µg/l
Niacina	-	µg/l
Ácido pantotênico	-	µg/l
Ácido p-aminobenzóico	-	µg/l
Vitamina B ₆	-	µg/l
Extrato de levedura	5,0	g/l
Líquido de maceração de milho	-	g/l
Polipeptona	10,0	g/l
NH ₄ Cl	0,4	g/l
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,001	g/l

O aparelho de fermentação contínua do tipo separação de membrana exibido na Fig. 1 foi carregado com 1,5 l de meio de fermentação de ácido succínico (Tabela 9) e 75 ml do cultivo prévio preliminar foram inoculados. O microorganismo foi cultivado continuamente da mesma forma

5 que no Exemplo 13, exceto pelo fato de que a aeração de CO₂ no banho de reação de fermentação 1 foi de 75 ml/min, a aeração de CO₂ no tanque de membrana de separação foi de 150 ml/min, a temperatura foi de 39 °C e o pH foi ajustado em 6, 8 com 5,5 M NaCO₃. A concentração de ácido succínico produzida no líquido de fermentação de permeação de membrana e a

10 concentração de glicose residual foram medidas em momento apropriado. A velocidade de produção de ácido succínico e o rendimento de ácido succínico, calculados a partir da concentração de ácido succínico e de glicose, são exibidos na Tabela 10. A diferença de pressão transmembrana variou dentro de 2 kPa em todo o período de fermentação contínua.

EXEMPLO 16**PRODUÇÃO DE ÁCIDO SUCCÍNICO POR MEIO DE FERMENTAÇÃO CONTÍNUA (Nº 4)**

A produção de ácido succínico foi conduzida utilizando o aparelho de fermentação contínua da Fig. 2. O meio foi utilizado após esterilização a vapor em alta pressão (121 °C, quinze minutos). As concentrações de ácido succínico e glicose foram medidas da mesma forma que no Exemplo 13. Como membrana de separação, foi utilizada a membrana porosa preparada no Exemplo de Referência 2. As condições de operação neste exemplo são idênticas ao Exemplo 14, exceto pela regulação da quantidade de água de permeação de membrana a seguir.

Regulagem da quantidade de água de permeação da membrana:
regulagem da velocidade de fluxo por diferença de pressão transmembrana

(do início da fermentação contínua até 100 horas: regulada em 0,1 kPa ou mais a 5 kPa ou menos;

15 - 100 horas a 200 horas: regulada em 0,1 kPa ou mais a 2 kPa ou menos; e

 - 200 horas a 280 horas: regulada em 0,1 kPa ou mais a 20 kPa ou menos).

Neste exemplo, foi conduzida a produção contínua de ácido succínico por linhagem de *Actinobacillus succinogenes* ATCC 55618 como microorganismo que possui capacidade de produção de ácido succínico. O cultivo contínuo foi conduzido da mesma forma que no Exemplo 14, exceto pelo fato de que, na produção contínua de ácido succínico por *Actinobacillus succinogenes*, a aeração de CO₂ no banho de reação de fermentação foi de 75 ml/min e o pH foi ajustado em 6,8 com 5,5 M de NaCO₃.

Em primeiro lugar, 75 mL de meio de fermentação de ácido succínico para *Actinobacillus* exibido na Tabela 9 e 4,0 g de MgCO₃ foram adicionados a tubo de ensaio de 100 ml de soro, seguidos pela substituição do

gás no tubo por CO₂ e esterilização sob aquecimento. 7,5 ml de suspensão bacteriana da linhagem ATCC55618 armazenados anteriormente em estado congelado foram inoculados no meio e cultivados a 37 °C por 24 horas para preparar cultivo de semente (cultivo prévio preliminar). O aparelho de fermentação contínua exibido na Fig. 2 foi carregado com 1,5 l de meio de fermentação de ácido succínico (Tabela 7) e 75 ml do cultivo prévio preliminar foram inoculados no meio e cultivados por 24 horas com pH mantido em 6,8 (cultivo prévio). Após o término do cultivo prévio, o meio de fermentação de ácido succínico da Tabela 9 foi alimentado continuamente e a quantidade de água de permeação de membrana foi regulada de forma que a quantidade do líquido de fermentação no aparelho de fermentação contínua do tipo de separação da Fig. 2 se tornasse 1,5 l, por meio do quê ácido pirúvico foi produzido por fermentação contínua. A concentração de ácido pirúvico produzida no líquido de fermentação de permeação de membrana e a concentração de glicose residual foram medidas em momento apropriado. A velocidade de produção de ácido succínico e o rendimento de ácido succínico, calculados a partir da concentração de ácido succínico e de glicose, são exibidos na Tabela 10. A diferença de pressão transmembrana variou dentro de 2 kPa em todo o período de fermentação contínua.

EXEMPLO COMPARATIVO 8

PRODUÇÃO DE ÁCIDO SUCCÍNICO POR MEIO DE FERMENTAÇÃO CONTÍNUA (Nº 2)

A produção de ácido succínico por *Actinobacillus succinogenes* foi conduzida conforme segue.

50 ml de meio de fermentação de ácido succínico para *Actinobacillus* exibido na Tabela 9 e 4,0 g de MgCO₃ foram adicionados a tubo de ensaio de 100 ml de soro, seguidos pela substituição do gás no tubo por CO₂ e esterilização sob aquecimento. 5 ml de suspensão bacteriana de *Actinobacillus succinofenes* ATCC 55618 anteriormente criopreservada foram

inoculados no meio e cultivados a 37 °C por 24 horas para preparar cultivo de semente. Um litro de meio de fermentação exibido na Tabela 9 foi ajustado em pH 6,8 e adicionado a fermentador de mini-jarra (2 l, tipo BMJ, fabricado pela ABLE) e esterilizado por meio de aquecimento (120 °C, vinte minutos). Gás CO₂ foi introduzido em velocidade de 50 ml/min com aspersor e a temperatura foi regulada em 39 °C. 50 ml do cultivo de semente acima foram inoculados no meio e cultivados mediante agitação a 600 rpm com lâmina de agitação fixada a ele enquanto o pH era ajustado em 6, 8 com 5, 5 M de NaCO₃. Os resultados são exibidos na Tabela 10.

TABELA 10

	Exemplo Comparativo 8	Exemplo 15	Exemplo 16
Tempo de fermentação (h)	49	254	280
Glicose introduzida (g)	100	1637	2182
Ácido succínico formado (g)	72	1193	1520
Glicose não utilizada (g)	4	25	11
Rendimento (g/g)	0,75	0,74	0,70
Velocidade de produção (g/l/h)	1,12	3,13	3,62

A velocidade de produção de ácido succínico foi significativamente aprimorada pelo método de fabricação de produto químico de acordo com a presente invenção utilizando os aparelhos de fermentação exibidos nas Figs. 1 e 2.

EXEMPLO 17**PRODUÇÃO CONTÍNUA DE ÁCIDO SUCCÍNICO POR MEIO DE FERMENTAÇÃO CONTÍNUA****(Nº 5)**

A produção de ácido succínico foi conduzida utilizando o aparelho de fermentação contínua do tipo separação de membrana da Fig. 1. As concentrações de ácido succínico e glicose foram medidas da mesma forma que no Exemplo 13. O meio foi utilizado após esterilização a vapor em alta

pressão (121 °C, quinze minutos). Como membrana de separação, foi utilizada a membrana porosa preparada no Exemplo de Referência 2. As condições de operação neste exemplo são idênticas ao Exemplo 13, exceto pela regulagem da quantidade de água de permeação de membrana a seguir.

5 Regulagem da quantidade de água de permeação da membrana:
regulagem da velocidade de fluxo por diferença de pressão transmembrana

(do início da fermentação contínua até 80 horas: regulada em 0,1 kPa ou mais a 5 kPa ou menos;

- 80 horas a 140 horas: regulada em 0,1 kPa ou mais a 2
10 kPa ou menos; e

- 140 horas a 200 horas: regulada em 0,1 kPa ou mais a 20 kPa ou menos).

Neste exemplo, foi conduzida a produção contínua de ácido succínico por linhagem de *Escherichia coli* B ATCC 11303 como
15 microorganismo que possui capacidade de produção de ácido succínico. 150 ml de meio de cultivo de semente que consiste de 12 g/l de glicose, 10 g/l de polipeptona, 5 g/l de extrato de levedura, 1 g/L de K₂HPO₄, 1 g/l de NaCl e 0,2 g/l de MgCl₂ foram introduzidos em frasco Erlenmeyer de 200 ml e ajustados em pH 6, 8. Após a adição de 7,5 g de MgCO₃, o meio foi esterilizado por meio
20 de aquecimento e resfriado à temperatura ambiente e, em porta-luvas anaeróbica, linhagem ATCC 11303 foi inoculada no meio e mantida em cultivo estacionário por uma noite a 37 °C (cultivo prévio preliminar). O aparelho de fermentação contínua exibido na Fig. 1 foi carregado com 1,5 l de meio de fermentação de ácido succínico que consiste de 12 g/l de glicose, 10 g/l de polipeptona, 5 g/l de extrato de levedura, 1 g/l de K₂HPO₄, 1 g/l de NaCl e 0,2
25 g/l de MgCl₂ e 150 ml do cultivo prévio preliminar foi inoculado no meio. A fermentação contínua de ácido succínico foi conduzida sob as mesmas condições do Exemplo 13, exceto pelo fato de que a temperatura de

fermentação foi de 37 °C.

Após cultivo prévio por 24 horas, o microorganismo foi cultivado continuamente enquanto o meio de fermentação de ácido succínico exibido na Tabela 11 era alimentado continuamente e a quantidade de água de permeação de membrana foi regulada de forma que a quantidade do líquido de fermentação no aparelho de fermentação contínua se tornasse 2 l.

TABELA 11

MEIO DE FERMENTAÇÃO DE ÁCIDO SUCCÍNICO

Glicose	50	g/l
Polipeptona	10	g/l
Extrato de levedura	5	g/l
Di-hidrogênio fosfato de potássio	1	g/l
Cloreto de sódio	1	g/l
Cloreto de magnésio	0,2	g/l

A concentração de ácido succínico produzida no líquido de fermentação de permeação de membrana e a concentração de glicose residual foram medidas em momento apropriado. A velocidade de produção de ácido succínico e o rendimento de ácido succínico, calculados a partir da concentração de ácido succínico e de glicose, são exibidos na Tabela 12. A diferença de pressão transmembrana variou dentro de 2 kPa em todo o período de fermentação contínua.

EXEMPLO 18

PRODUÇÃO CONTÍNUA DE ÁCIDO SUCCÍNICO POR MEIO DE FERMENTAÇÃO CONTÍNUA

(Nº 6)

A produção de ácido succínico foi conduzida utilizando o aparelho de fermentação contínua da Fig. 2. O meio foi utilizado após esterilização a vapor em alta pressão (121 °C, quinze minutos). As concentrações de ácido

succínico e glicose foram medidas da mesma forma que no Exemplo 13. Como membrana de separação, foi utilizada a membrana porosa preparada no Exemplo de Referência 2. As condições de operação neste exemplo são idênticas ao Exemplo 14, exceto pela regulação da quantidade de água de permeação de membrana a seguir.

Regulagem da quantidade de água de permeação da membrana:
regulagem da velocidade de fluxo por diferença de pressão transmembrana
(do início da fermentação contínua até 80 horas: regulada em 0,1 kPa ou mais a 5 kPa ou menos;

- 10 - 80 horas a 120 horas: regulada em 0,1 kPa ou mais a 2 kPa ou menos; e
- 120 horas a 180 horas: regulada em 0,1 kPa ou mais a 20 kPa ou menos).

Neste exemplo, foi conduzida a produção contínua de ácido succínico por linhagem de *Escherichia coli* B ATCC 11303 como microorganismo que possui capacidade de produção de ácido succínico. 150 ml de meio de cultivo de semente que consiste de 12 g/l de glicose, 10 g/l de polipeptona, 5 g/l de extrato de levedura, 1 g/L de K_2HPO_4 , 1 g/l de NaCl e 0,2 g/l de $MgCl_2$ foram introduzidos em frasco Erlenmeyer de 200 ml e ajustados em pH 6,8. Após a adição de 7,5 g de $MgCO_3$, o meio foi esterilizado por meio de aquecimento e resfriado à temperatura ambiente e linhagem ATCC 11303 foi inoculada no meio e mantida em cultivo estacionário por uma noite a 37 °C (cultivo prévio preliminar). O aparelho de fermentação contínua exibido na Fig. 2 foi carregado com 1,5 l de meio de fermentação de ácido succínico que consiste de 12 g/l de glicose, 10 g/l de polipeptona, 5 g/l de extrato de levedura, 1 g/L de K_2HPO_4 , 1 g/l de NaCl e 0,2 g/l de $MgCl_2$ e 150 ml do cultivo prévio preliminar foram inoculados no meio. O microorganismo foi cultivado por 24 horas sob temperatura de 37 °C enquanto o pH era ajustado em 6,8 com 5,5 M

de NaCO_3 (cultivo prévio). Após o término do cultivo prévio, o microorganismo foi cultivado enquanto o meio de fermentação de ácido succínico exibido na Tabela 11 era alimentado continuamente e a quantidade de água de permeação de membrana foi regulada de forma que a quantidade do líquido de fermentação no aparelho de fermentação contínua se tornasse 1,5 l. A velocidade de produção de ácido succínico e o rendimento de ácido succínico, calculados a partir da concentração de ácido succínico e de glicose, são exibidos na Tabela 12. A diferença de pressão transmembrana variou dentro de 2 kPa em todo o período de fermentação contínua.

EXEMPLO COMPARATIVO 9

PRODUÇÃO DE ÁCIDO SUCCÍNICO POR MEIO DE FERMENTAÇÃO EM BATELADAS (Nº 3)

A produção de ácido succínico por meio de fermentação em bateladas de *Escherichia coli* foi conduzida conforme segue.

100 ml de meio de cultivo de semente que consiste de 12 g/l de glicose, 10 g/l de polipeptona, 5 g/l de extrato de levedura, 1 g/L de K_2HPO_4 , 1 g/l de NaCl e 0,2 g/l de MgCl_2 foram introduzidos em frasco Erlenmeyer de 1250 ml e ajustados em pH 6,8. Após a adição de 5 g de MgCO_3 , o meio foi esterilizado por meio de aquecimento e resfriado à temperatura ambiente e, em porta-luvas anaeróbico, linhagem de *Escherichia coli* B ATCC 11303 foi inoculada no meio e mantida em cultivo estacionário por uma noite a 37 °C. Um litro de meio de fermentação que consiste de 12 g/l de glicose, 10 g/l de polipeptona, 5 g/l de extrato de levedura, 1 g/l de K_2HPO_4 , 1 g/l de NaCl e 0,2 g/l de MgCl_2 foram ajustados em pH 6,8, adicionados a fermentador de mini-jarra (2 l, tipo BMJ, fabricado pela ABLE) e esterilizado por meio de aquecimento (120 °C, vinte minutos). Gás CO_2 foi introduzido em velocidade de 50 ml/min com aspersor e a temperatura foi regulada em 37 °C. 100 ml do cultivo de semente acima foram inoculados no meio e cultivados mediante agitação a 600 rpm com lâmina de agitação fixada a ele enquanto o pH era

ajustado em 6,8 com 5,5 M de NaCO_3 . O cultivo foi conduzido enquanto 200 ml de solução de 100 g/l de glicose eram adicionados pouco a pouco, de forma que a concentração de glicose no cultivo não excedesse 20 g/l. Os resultados são exibidos na Tabela 12.

5

TABELA 12

	Exemplo Comparativo 9	Exemplo 17	Exemplo 18
Tempo de fermentação (h)	36	200	180
Glicose introduzida (g)	32	732	850
Ácido succínico formado (g)	3	72	81
Glicose não utilizada (g)	0	12	40
Rendimento (g/g)	0,1	0,1	0,1
Velocidade de produção (g/l/h)	0,09	0,24	0,30

A velocidade de produção de ácido succínico foi significativamente aprimorada pelo método de fabricação de produto químico de acordo com a presente invenção utilizando os aparelhos de fermentação exibidos nas Figs. 1 e 2.

10

EXEMPLO 19**PRODUÇÃO DE 1,3-PROPANODIOL POR MEIO DE FERMENTAÇÃO CONTÍNUA (Nº 1)**

A produção de 1,3-propanodiol foi conduzida utilizando o aparelho de fermentação contínua do tipo separação de membrana da Fig. 1 e meio de produção de 1,3-propanodiol com a composição exibida na Tabela 13.

15 Em primeiro lugar, é descrito o método de isolamento, identificação e medição de 1,3-propanodiol como produto.

A conversão de glicerol em 1,3-propanodiol foi confirmada por meio de HPLC. Esta análise foi conduzida utilizando métodos padrão e materiais disponíveis para os técnicos no campo da técnica de cromatografia.

Em método apropriado, foi utilizado sistema HPLC Waters Maxima 820 utilizando detecção de RI e UV (210 nm). Amostra recebeu injeção em velocidade de fluxo de 0,5 ml/min em coluna Shodex SH-1011 (8 mm x 300 mm, adquirida da Waters, Milford MA) regulada em temperatura de 50 °C e
5 equipada com coluna prévia Shodex SH-1011P (6 mm x 50 mm) com 0,01 N H₂SO₄ como fase móvel. Quando a análise quantitativa estava por ser conduzida, ácido trimetilacético de quantidade conhecida foi utilizado como padrão externo para preparar a amostra. Os tempos de retenção de glicose (detecção de RI), glicerol, 1,3-propanodiol (detecção de RI) e ácido
10 trimetilacético (detecção de RI e UV) foram de cerca de 15 minutos, 20 minutos, 26 minutos e 35 minutos, respectivamente.

A produção de 1,3-propanodiol foi confirmada por meio de GC/MS. Esta análise foi conduzida utilizando métodos padrão e materiais disponíveis para os técnicos no campo da técnica de GC/MS. Utilizou-se, por exemplo, sistema
15 cromatográfico de gás Hewlett Packard 5890 Série II conectado a detector seletivo de massa Hewlett Packard 5971 Série (EI) e coluna HP-INNOWax (comprimento de 30 m, diâmetro interno de 0,25 mm, espessura de filme de 0,25 µm). O tempo de retenção e espectro de massa de 1,3-propanodiol formado foram comparados com os de 1,3-propanodiol padrão (m/e: 57, 58).

20 Também foi conduzida a derivação de amostra. 30 µl de ácido perclórico concentrado (70% v/v) foram adicionados a 1,0 ml de amostra (tal como sobrenadante de cultivo). Após a mistura, a amostra foi liofilizada. Mistura 1:1 (300 µl) de bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida:piridina foi adicionada ao material liofilizado, misturada vigorosamente em seguida e mantida a 65 °C
25 por uma hora. A amostra foi tornada transparente por meio de remoção de materiais insolúveis por centrifugação. O líquido resultante foi separado em duas fases e a sua fase superior foi utilizada em análise. A amostra foi submetida a cromatografia sobre coluna DB-5 (48 m, diâmetro interno de 0,25

mm, espessura do filme de 0,25 μm , da J&W Scientific) e o tempo de retenção e espectro de massa do derivado de 1,3-propanodiol obtido a partir do sobrenadante de cultivo foram comparados com os obtidos da amostra padrão. O espectro de massa de 1,3-propanodiol derivado de TMS contém 205, 177, 130 e 115 unidades de massa atômica (AMU) de íons característicos.

O meio foi utilizado após esterilização a vapor em alta pressão (121 °C, quinze minutos). Como material de elemento de membrana de separação, utilizou-se moldagem de resina de polissulfona e aço inoxidável. Como membrana de separação, foi utilizada a membrana porosa preparada no Exemplo de Referência 2. A menos que indicado em contrário, as condições de operação deste exemplo são as seguintes:

Capacidade de tanque de reação: 2 (L)

Membrana de separação utilizada: membrana de filtragem de fluoreto de polivinilideno

Área de filtragem eficaz do elemento de separação de membrana: 120 cm^2

Controle de temperatura: 37 (°C)

Aeração do tanque de reação de fermentação: 0,6 (l/min) de gás nitrogênio

Velocidade de agitação do tanque de reação de fermentação: 800 (rpm)

Ajuste de pH: ajustado em pH 7,0 com 5 N NaOH

Esterilização: o tanque de cultivo, incluindo o elemento de membrana de separação, e o meio utilizado, foram esterilizados com vapor sob alta pressão em autoclave a 121 °C por vinte minutos.

Regulagem da quantidade de água de permeação da membrana: regulagem da velocidade de fluxo por diferença de pressão transmembrana (do início da fermentação contínua até 100 horas: regulada em

0,1 kPa ou mais a 5 kPa ou menos;

- 100 horas a 200 horas: regulada em 0,1 kPa ou mais a 2

kPa ou menos; e

- 200 horas a 320 horas: regulada em 0,1 kPa ou mais a 20

5 kPa ou menos).

Linhagem ATCC 25955 de *Klebsiella pneumoniae* foi utilizada como microorganismo, meio de fermentação de 1,3-propanodiol que possui a composição exibida na Tabela 13 foi utilizado como meio e a concentração de 1,3-propanodiol como produto foi avaliada por meio do método de HPLC descrito acima.

10 A concentração de glicose foi medida com Teste de Glicose Wako C (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.).

TABELA 13

MEIO DE FERMENTAÇÃO DE 1,3-PROPANODIOL

Glicose	10 g/l
Glicerol	40 g/l
Sulfato de amônio	5,35 g/l
Cloreto de potássio	0,75 g/l
Di-hidrogênio fosfato de sódio	1,38 g/l
Sulfato de magnésio · 7 H ₂ O	0,26 g/l
Sulfato de sódio	0,28 g/l
Ácido cítrico	0,42 g/l
Extrato de levedura	1 g/l
Cloreto de cálcio · 2H ₂ O	0,29 mg/L
Cloreto de ferro · 6H ₂ O	0,025 g/l
Cloreto de manganês · 6 H ₂ O	0,01 g/l
Cloreto de zinco	0,003 g/l
Cloreto de cobalto · 6 H ₂ O	0,002 g/l
Cloreto de cobre · 6 H ₂ O	0,85 mg/l
	pH 7,0

Em primeiro lugar, a linhagem *Klebsiella pneumoniae* ATCC 25955 foi cultivada com agitação por uma noite em 5 ml de meio de produção de 1,3-propanodiol em tubo de ensaio (antes do cultivo prévio preliminar). O cultivo resultante foi inoculado em 50 ml de meio de produção de 1,3-propanodiol novo e cultivado com agitação por 24 horas a 30 °C em frasco Sakaguchi de 500 ml (cultivo prévio preliminar). O cultivo prévio preliminar foi inoculado em 1,5 l de meio de fermentação de 1,3-propanodiol no aparelho de fermentação contínua do tipo de separação de membrana exibido na Fig. 1, tanque de reação de fermentação 1 foi agitado a 800 rpm com agitador 5 a ele fixado, seguido pela regulação de aeração, controle de temperatura e ajuste de pH do tanque de reação 1 e o microorganismo foi cultivado por 24 horas (cultivo prévio). Imediatamente após o término de cultivo prévio, a bomba de circulação de líquido de fermentação e o microorganismo foi cultivado continuamente sob as condições em que, além das condições de operação no momento do cultivo prévio, tanque de separação de membrana 2 foi aerado, meio de produção de 1,3-propanodiol (concentração de glicerol: 100 g/l) foi alimentado continuamente e a quantidade de água de permeação de membrana foi regulada de forma que a quantidade do líquido de fermentação no aparelho de fermentação contínua se tornasse 1,5 l, por meio do quê 1,3-propanodiol foi produzido por fermentação contínua. Neste teste de fermentação contínua, a quantidade de água de permeação de membrana foi regulada e alterada sob as condições de controle de água de permeação de membrana descritas acima, durante o quê a diferença de cabeça d'água foi medida como a diferença de pressão transmembrana com aparelho de regulação de diferença de cabeça d'água 3. A concentração de 1,3-propanodiol produzida no líquido de fermentação de permeação de membrana e a concentração de glicose residual foram medidas em momento apropriado. A velocidade de produção de 1,3-propanodiol calculada a partir do 1,3-

propanodiol e glicerol introduzido é exibida na Tabela 14.

Como resultado do teste de fermentação por 320 horas, produção estável de 1,3-propanodiol por fermentação contínua foi viável por meio do método de fabricação de produto químico de acordo com a presente invenção utilizando o aparelho de fermentação contínua do tipo de separação de membrana exibido na Fig. 1. A diferença de pressão transmembrana variou dentro de 2 kPa em todo o período de fermentação contínua.

EXEMPLO 20

PRODUÇÃO DE 1,3-PROPANODIOL POR MEIO DE FERMENTAÇÃO CONTÍNUA (Nº 2)

A produção de 1,3-propanodiol foi conduzida utilizando o aparelho de fermentação contínua da Fig. 2 e meio de produção de 1,3-propanodiol com a composição exibida na Tabela 13.

O meio foi utilizado após esterilização a vapor em alta pressão (121 °C, quinze minutos). Como material de elemento de membrana de separação, utilizou-se moldagem de resina de polissulfona e aço inoxidável. Como membrana de separação, foi utilizada a membrana porosa preparada no Exemplo de Referência 2. A menos que indicado em contrário, as condições de operação deste exemplo são as seguintes:

Capacidade do tanque de reação de fermentação: 2 (L)

Membrana de separação utilizada: membrana de filtração de fluoreto de polivinilideno

Área de filtração eficaz do elemento de separação de membrana:
120 cm²

Controle de temperatura: 37 (°C)

Aeração do tanque de reação de fermentação: 0,6 (l/min) de gás nitrogênio

Velocidade de agitação do tanque de reação de fermentação: 800

(rpm)

Ajuste de pH: ajustado em pH 7,0 com 5 N NaOH

Esterilização: o tanque de cultivo, incluindo o elemento de membrana de separação, e o meio utilizado, foram esterilizados com vapor sob
5 alta pressão em autoclave a 121 °C por vinte minutos.

Regulagem da quantidade de água de permeação da membrana:
regulagem da velocidade de fluxo por diferença de pressão transmembrana

(do início da fermentação contínua até 100 horas: regulada em
0,1 kPa ou mais a 5 kPa ou menos;

- 10 - 100 horas a 200 horas: regulada em 0,1 kPa ou mais a 2
kPa ou menos; e
- 200 horas a 264 horas: regulada em 0,1 kPa ou mais a 20
kPa ou menos).

Linhagem ATCC 25955 de *Klebsiella pneumoniae* foi utilizada
15 como microorganismo, meio de produção de 1,3-propanodiol que possui a
composição exibida na Tabela 9 foi utilizado como meio e a concentração de
1,3-propanodiol como produto foi medida por meio do método de HPLC
descrito acima. A concentração de glicose foi medida com Teste de Glicose
Wako C (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.).

20 Em primeiro lugar, a linhagem *Klebsiella pneumoniae* ATCC
25955 foi cultivada com agitação por uma noite em 5 ml de meio de produção
de 1,3-propanodiol em tubo de ensaio (antes do cultivo prévio preliminar). O
cultivo resultante foi inoculado em 50 ml de meio de produção de 1,3-
propanodiol novo e cultivado com agitação por 24 horas a 30 °C em frasco
25 Sakaguchi de 500 ml (cultivo prévio preliminar). O cultivo prévio preliminar foi
inoculado em 1,5 l de meio de fermentação de 1,3-propanodiol no aparelho de
fermentação contínua do tipo de separação de membrana exibido na Fig. 2,
tanque de reação de fermentação 1 foi agitado a 800 rpm com agitador 5 a ele

fixado, seguido pela regulação de aeração, controle de temperatura e ajuste de pH do tanque de reação de fermentação 1 e o microorganismo foi cultivado por 24 horas (cultivo prévio). Imediatamente após o término do cultivo prévio, o microorganismo foi cultivado continuamente em que meio de produção de 1,3-propanodiol (concentração de glicerol: 100 g/l) foi alimentado continuamente e a quantidade de água de permeação de membrana foi regulada de forma que a quantidade do líquido de fermentação no aparelho de fermentação contínua integrada por membrana se tornasse 1,5 l, por meio do quê 1,3-propanodiol foi produzido por fermentação contínua. Neste teste de fermentação contínua, a quantidade de água de permeação de membrana foi regulada e alterada sob as condições de controle de água de permeação de membrana descritas acima, durante o quê a diferença de cabeça d'água foi medida como a diferença de pressão transmembrana com aparelho de regulação de diferença de cabeça d'água 3. A concentração de 1,3-propanodiol produzida no líquido de fermentação de permeação de membrana e a concentração de glicose residual foram medidas em momento apropriado. A velocidade de produção de 1,3-propanodiol calculada a partir do 1,3-propanodiol medido e glicerol introduzido é exibida na Tabela 14. Como resultado do teste de fermentação por 264 horas, produção estável de 1,3-propanodiol por fermentação contínua foi viável por meio do método de fabricação de produto químico de acordo com a presente invenção utilizando o aparelho de fermentação contínua da Fig. 2. A diferença de pressão transmembrana variou dentro de 2 kPa em todo o período de fermentação contínua.

EXEMPLO COMPARATIVO 10

PRODUÇÃO DE 1,3-PROPANEDIOL POR MEIO DE FERMENTAÇÃO EM BATELADAS ALIMENTADAS

Como forma de fermentação utilizando microorganismo, a maior parte da fermentação em bateladas típica foi conduzida em fermentador de

jarra de dois litros para avaliar a sua produtividade de 1,3-propanodiol. O meio foi utilizado após esterilização a vapor em alta pressão (121 °C, quinze minutos). Linhagem de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 25955 foi utilizada como microorganismo neste exemplo comparativo, a concentração de 1,3-propanodiol na forma de produto foi avaliada por meio de HPLC e a concentração de glicose foi medida com Teste de Glicose Wako C (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). As condições de operação do Exemplo Comparativo 10 são as seguintes:

Capacidade do tanque de reação (quantidade do meio de produção de 1,3-propanodiol): 1,0 (L)

Controle de temperatura: 37 (°C)

Aeração do tanque de reação de fermentação: 0,4 (l/min) de gás nitrogênio

Velocidade de agitação do tanque de reação de fermentação: 300 (rpm)

Ajuste de pH: ajustado em pH 7,0 com 5 N NaOH

Em primeiro lugar, a linhagem *Klebsiella pneumoniae* ATCC 25955 foi cultivada com agitação por uma noite em 5 ml de meio de produção de 1,3-propanodiol em tubo de ensaio (cultivo prévio preliminar). O cultivo prévio preliminar foi inoculado em 50 ml de meio de produção de 1,3-propanodiol novo e cultivado com agitação por 24 horas em frasco Sakaguchi de 500 ml (cultivo prévio). O cultivo prévio foi inoculado em 1,5 l de meio de produção de 1,3-propanodiol em fermentador de jarra. O microorganismo foi submetido a fermentação por bateladas alimentadas por meio de alimentação contínua de meio de produção de 1,3-propanodiol (concentração de glicerol: 500 g/l), de forma que a concentração de glicerol aumentasse de 0 g/l para 10 g/l. Os resultados são exibidos na Tabela 14.

TABELA 14

	Exemplo Comparativo 10	Exemplo 19	Exemplo 20
Tempo de fermentação (h)	42	320	264
Glicerol introduzido (g)	200	1620	1320
1,3-Propanodiol produzido (g)	53	391	313
Glicerol não utilizado (g)	5	55	50
Rendimento de 1,3-propanediol (g/g)	0.27	0.25	0.25
Velocidade de produção de 1,3-propanodiol (g/litro/h)	1.26	2.50	3.33

A velocidade de produção de 1,3-propoanodiol foi significativamente aprimorada pelo método de fabricação de produto químico de acordo com a presente invenção utilizando os aparelhos de fermentação exibidos nas Figs. 1 e 2.

5

EXEMPLO 21

PRODUÇÃO DE ÁCIDO ITACÔNICO POR MEIO DE FERMENTAÇÃO CONTÍNUA (Nº 1)

A produção de ácido itacônico foi conduzida utilizando o aparelho de fermentação contínua do tipo separação de membrana da Fig. 1. Foi utilizado o meio que possui a composição exibida na Tabela 15 após esterilização a vapor em alta pressão (121 °C, quinze minutos). Como material de elemento de membrana de separação, utilizou-se moldagem de resina de polissulfona e aço inoxidável. Como membrana de separação, foi utilizada a membrana porosa preparada no Exemplo de Referência 2. A menos que indicado em contrário, as condições de operação deste exemplo são as seguintes:

15

Capacidade do tanque de reação de fermentação: 2 (L)

Membrana de separação utilizada: membrana de filtração de fluoreto de polivinilideno

Área de filtragem eficaz do elemento de separação de membrana:
120 cm²

Controle de temperatura: 35 (°C)

Aeração do tanque de reação de fermentação: 1.5 (l/min)

5 Velocidade de agitação do tanque de reação de fermentação: 200
(rpm)

Esterilização: o tanque de cultivo, incluindo o elemento de membrana de separação, e o meio utilizado, foram esterilizados com vapor sob alta pressão em autoclave a 121 °C por vinte minutos.

10 Ajuste de pH: ajustado em pH 5 com 4 N NaOH

Regulagem da quantidade de água de permeação da membrana:
regulagem da velocidade de fluxo por diferença de pressão transmembrana

(do início da fermentação contínua até 100 horas: regulada em
0,1 kPa ou mais a 5 kPa ou menos;

15 - 100 horas a 200 horas: regulada em 0,1 kPa ou mais a 2
kPa ou menos; e

- 200 horas a 300 horas: regulada em 0,1 kPa ou mais a 20
kPa ou menos).

20 Linhagem de *Aspergillus terreus* ATCC 10020 foi utilizada como
microorganismo, meio de fermentação de ácido itacônico que possui a
composição exibida na Tabela 11 foi utilizado como meio, a concentração de
ácido itacônico na forma de produto foi medida por meio de método de
Koppeshaar (*Biseibutsu Kogaku Kouza (Bacterial Optics Coourse)*, Vol. 5,
Kabino Riyou Kogyo (*Use and Industry of Mold*), págs. 72-73, publicado pela
25 Kyoritsu Shuppan Co., Ltd. (1956)). A concentração de glicose foi medida com
Teste de Glicose Wako C (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.).

TABELA 15

MEIO DE FERMENTAÇÃO DE ÁCIDO ITACÔNICO

	Cultivo prévio	Fermentação	
		contínua/em bateladas	
Glicose	55	70	g/l
Líquido de maceração de milho	3	2,0	g/l
Nitrato de amônio	5	3,0	g/l
Sulfato de magnésio	2	0,1	g/l
Adecanol LG126 (agente antiespumante)	-	0,1	g/l

Em primeiro lugar, linhagem de *Aspergillus terreus* ATCC 10020 foi cultivada com agitação por uma noite em 5 ml de meio de cultivo prévio exibido na Tabela 15 em tubo de ensaio (antes do cultivo prévio preliminar). O cultivo resultante foi inoculado em 100 ml de meio de cultivo prévio novo e

5 cultivado com agitação por 48 horas a 35 °C em frasco Sakaguchi de 500 ml (cultivo prévio preliminar). O cultivo prévio preliminar foi inoculado em 1,5 l de meio de fermentação contínua/em bateladas no aparelho de fermentação contínua do tipo de separação de membrana exibido na Fig. 1, tanque de reação de fermentação 1 foi agitado a 200 rpm com agitador 5 a ele fixado,

10 seguido pela regulagem de aeração e controle de temperatura do tanque de reação de fermentação 1 e o microorganismo foi cultivado por 24 horas (cultivo prévio). Imediatamente após o término do cultivo prévio, a bomba de circulação de líquido de fermentação foi operada e o microorganismo foi cultivado continuamente sob as condições em que, além das condições de operação no

15 momento do cultivo prévio, tanque de separação de membrana 2 foi aerado, meio de fermentação de ácido itacônico foi alimentado continuamente e a quantidade de água de permeação de membrana foi regulada de tal forma que a quantidade do líquido de fermentação no aparelho de fermentação contínua do tipo separação de membrana tornou-se 2 l, por meio do quê ácido itacônico

foi produzido por fermentação contínua. Neste teste de fermentação contínua, a quantidade de água de permeação de membrana foi regulada e alterada sob as condições de controle de água de permeação de membrana descritas acima, durante o quê a diferença de cabeça d'água foi medida como a diferença de pressão transmembrana com aparelho de regulação de diferença de cabeça d'água 3. A concentração de ácido itacônico produzida no líquido de fermentação de permeação de membrana e a concentração de glicose residual foram medidas em momento apropriado. A velocidade de produção de ácido itacônico calculada a partir do ácido itacônico e glicose introduzida calculada a partir da concentração de glicose são exibidas na Tabela 16.

A produção estável de ácido itacônico por fermentação contínua foi viável por meio do método de fabricação de produto químico de acordo com a presente invenção utilizando o aparelho de fermentação contínua do tipo de separação de membrana da Fig. 1. A diferença de pressão transmembrana variou dentro de 2 kPa em todo o período de fermentação contínua.

EXEMPLO 22

PRODUÇÃO DE ÁCIDO ITACÔNICO POR MEIO DE FERMENTAÇÃO CONTÍNUA (Nº 2)

A produção de ácido itacônico foi conduzida utilizando o aparelho de fermentação contínua da Fig. 2. Foi utilizado o meio que possui a composição exibida na Tabela 15 após esterilização a vapor em alta pressão (121 °C, quinze minutos). Como material de elemento de membrana de separação, utilizou-se moldagem de resina de polissulfona e aço inoxidável. Como membrana de separação, foi utilizada a membrana porosa preparada no Exemplo de Referência 2. A menos que indicado em contrário, as condições de operação deste exemplo são as seguintes:

Capacidade do tanque de reação de fermentação: 2 (L)

Membrana de separação utilizada: Membrana de filtração de PVDF

Área de filtragem eficaz do elemento de separação de membrana:
120 cm²

Controle de temperatura: 35 (°C)

Aeração do tanque de reação de fermentação: 1,5 (l/min)

5 Velocidade de agitação do tanque de reação de fermentação: 200
(rpm)

Esterilização: o tanque de cultivo, incluindo o elemento de membrana de separação, e o meio utilizado foram esterilizados com vapor sob alta pressão em autoclave a 121 °C por vinte minutos.

10 Ajuste de pH: ajustado em pH 5 com 4 N NaOH

Regulagem da quantidade de água de permeação da membrana:
regulagem da velocidade de fluxo por diferença de pressão transmembrana

(do início da fermentação contínua até 100 horas: regulada em
0,1 kPa ou mais a 5 kPa ou menos;

15 - 100 horas a 200 horas: regulada em 0,1 kPa ou mais a 2
kPa ou menos; e

- 200 horas a 300 horas: regulada em 0,1 kPa ou mais a 20
kPa ou menos).

Levedura ATCC10020 de *Aspergillus terreus* foi utilizada como
20 microorganismo, meio de fermentação de ácido itacônico que possui a
composição exibida na Tabela 11 foi utilizado como meio e a concentração de
ácido itacônico na forma de produto foi medida por meio do método exibido no
Exemplo 17. A concentração de glicose foi medida com Teste de Glicose Wako
C (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.).

25 Em primeiro lugar, linhagem de *Aspergillus terreus* ATCC 10020
foi cultivada com agitação por uma noite em 5 ml de meio de cultivo prévio
exibido na Tabela 15 em tubo de ensaio (antes do cultivo prévio preliminar). O
cultivo resultante foi inoculado em 100 ml de meio de cultivo prévio novo e

cultivado com agitação por 48 horas a 35 °C em frasco Sakaguchi de 500 ml (cultivo prévio preliminar). O cultivo prévio preliminar foi inoculado em 1,5 l de meio de fermentação contínua/em bateladas no aparelho de fermentação contínua do tipo de separação de membrana exibido na Fig. 2, tanque de reação de fermentação 1 foi agitado a 200 rpm com agitador 5 a ele fixado, seguido pela regulação de aeração e controle de temperatura do tanque de reação de fermentação 1 e o microorganismo foi cultivado por 24 horas (cultivo prévio). Imediatamente após o término do cultivo prévio, o microorganismo foi cultivado continuamente enquanto meio de fermentação contínua/em bateladas foi alimentado continuamente e a quantidade de água de permeação de membrana foi regulada de tal forma que a quantidade do líquido de fermentação no aparelho de fermentação contínua tornou-se 1,5 l, por meio do quê foi produzido ácido itacônico por fermentação contínua. Neste teste de fermentação contínua, a quantidade de água de permeação de membrana foi regulada e alterada sob as condições de controle de água de permeação de membrana descritas acima, durante o quê a diferença de cabeça d'água foi medida como a diferença de pressão transmembrana com aparelho de regulação de diferença de cabeça d'água 3. A concentração de ácido itacônico produzida no líquido de fermentação de permeação de membrana e a concentração de glicose residual foram medidas em momento apropriado. A velocidade de produção de ácido itacônico calculada a partir do ácido itacônico e glicose introduzida calculada a partir da concentração de glicose são exibidas na Tabela 16.

A produção estável de ácido itacônico por meio de fermentação contínua foi viável por meio do método de fabricação de produto químico de acordo com a presente invenção utilizando o aparelho de fermentação contínua da Fig. 2. A diferença de pressão transmembrana variou dentro de 2 kPa em todo o período de fermentação contínua.

EXEMPLO COMPARATIVO 11**PRODUÇÃO DE ÁCIDO ITACÔNICO POR MEIO DE FERMENTAÇÃO EM BATELADAS**

Como forma de fermentação utilizando microorganismo, a maior parte da fermentação em bateladas típica foi conduzida em fermentador de jarra de dois litros para avaliar a sua produtividade de ácido itacônico. O meio exibido na Tabela 15 foi utilizado após esterilização a vapor em alta pressão (121 °C, quinze minutos). No Exemplo Comparativo 11, linhagem de *Aspergillus terreus* ATCC 10020 foi utilizada como microorganismo, a concentração de ácido itacônico na forma de produto foi avaliada por meio do método exibido no Exemplo 17 e a concentração de glicose foi medida com Teste de Glicose Wako C (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). As condições de operação do Exemplo Comparativo 11 são as seguintes:

Capacidade do tanque de reação de fermentação (quantidade de meio de fermentação de ácido itacônico): 1,5 (L)

15 Controle de temperatura: 35 (°C)

Aeração do tanque de reação de fermentação: 1,5 (l/min)

Velocidade de agitação do tanque de reação de fermentação: 200 (rpm)

Ajuste de pH: ajustado em pH 5 com 4 N NaOH

20 Em primeiro lugar, linhagem ATCC 10020 foi cultivada com agitação por uma noite em 5 ml de meio de cultivo prévio exibido na Tabela 1 em tubo de ensaio (cultivo prévio preliminar). O cultivo prévio preliminar foi inoculado em 50 ml de meio de cultivo prévio novo e cultivado com agitação por 48 horas em frasco Sakaguchi de 500 ml (cultivo prévio). O cultivo prévio
25 foi inoculado em 1,5 l do meio de fermentação contínua/em bateladas exibido na Tabela 15 em fermentador de jarra e submetido a fermentação em bateladas. Os resultados de fermentação em bateladas são exibidos na Tabela 16.

TABELA 16

		Exemplo Comparativo 11	Exemplo 21	Exemplo 22
Tempo de fermentação	(h)	80	300	300
Glicose introduzida	(g)	105	2090	1650
Ácido itacônico formado	(g)	55	1020	790
Glicose não utilizada	(g)	1	50	50
Rendimento	(g/g)	0.53	0.50	0.49
Velocidade de produção	(g/l/h)	0.46	1.7	1.7

A velocidade de produção de ácido itacônico foi significativamente aprimorada pelo método de fabricação de produto químico de acordo com a presente invenção utilizando os aparelhos de fermentação exibidos nas Figs. 1 e 2.

EXEMPLO 23**PRODUÇÃO DE CADAVERINA POR MEIO DE FERMENTAÇÃO CONTÍNUA (Nº 1)**

A produção de cadaverina foi conduzida utilizando o aparelho de fermentação contínua do tipo separação de membrana da Fig. 1 e meio de fermentação de cadaverina com a composição exibida na Tabela 17.

Em primeiro lugar, é descrito método de avaliação de cadaverina como produto. Cadaverina foi avaliada por meio do método de HPLC a seguir.

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

Fase móvel: 0,1% (p/p) ácido fosfórico aquoso: acetonitrila = 4,5:

5,5

Deteção: UV 360 nm

Tratamento prévio de amostra: 25 µl de 1,4-diaminobutano (0,03 M) como padrão interno, 150 µl de bicarbonato de sódio e solução em etanol de 2,4-dinitrofluorobenzeno (0,2 M) foram adicionados a 25 µl de amostra de análise, a ela misturados e a mistura foi mantida sob temperatura de 37 °C por

uma hora. 50 μ l da solução de reação foram dissolvidos em 1 ml de acetonitrila, centrifugados em seguida a 10.000 rpm por cinco minutos e 10 μ l do sobrenadante resultante foram analisados por meio de HPLC.

O meio foi utilizado após esterilização a vapor em alta pressão (121 °C, quinze minutos). Como material de elemento de membrana de separação, utilizou-se moldagem de resina de polissulfona e aço inoxidável. Como membrana de separação, foi utilizada a membrana porosa preparada no Exemplo de Referência 2. A menos que indicado em contrário, as condições de operação deste exemplo são as seguintes:

- 10 Capacidade do tanque de reação de fermentação: 2 (L)
- Membrana de separação utilizada: membrana de filtragem de fluoreto de polivinilideno
- Área de filtragem eficaz do elemento de separação de membrana: 120 cm²
- 15 Controle de temperatura: 30 (°C)
- Aeração do tanque de reação de fermentação: 1,5 (l/min) ar
- Velocidade de agitação do tanque de reação de fermentação: 800 (rpm)
- Ajuste de pH: ajustado em pH 7,0 com 3 M HCl e 3 M de água
- 20 com amônia
- Esterilização: o tanque de cultivo, incluindo o elemento de membrana de separação, e o meio utilizado, foram esterilizados com vapor sob alta pressão em autoclave a 121 °C por vinte minutos.
- Regulagem da quantidade de água de permeação da membrana:
- 25 regulagem da velocidade de fluxo por diferença de pressão transmembrana
- (do início da fermentação contínua até 100 horas: regulada em 0,1 kPa ou mais a 5 kPa ou menos;
- 100 horas a 200 horas: regulada em 0,1 kPa ou mais a 2

kPa ou menos; e

- 200 horas a 320 horas: regulada em 0,1 kPa ou mais a 20 kPa ou menos).

Linhagem de *Corynebacterium glutamicum* TR-CAD1 descrita em

5 JP-A nº 2004-222569 foi utilizada como microorganismo produtor de cadaverina e meio de produção de cadaverina que possui a composição exibida na Tabela 17 foi utilizado como meio. A concentração de cadaverina como produto foi medida por meio do método de HPLC. A concentração de glicose foi medida com Teste de Glicose Wako C (Wako Pure Chemical
10 Industries, Ltd.).

TABELA 17

MEIO DE FERMENTAÇÃO DE CADAVERINA

Glicose	150 g/l
Ácido cítrico	1 g/l
Uréia	15 g/l
Di-hidrogênio fosfato de potássio	0,5 g/l
Hidrogênio fosfato de dipotássio	0,5 g/l
Sulfato de magnésio · 7 H ₂ O	0,5 g/l
L-treonina	0,8 g/l
L-metionina	0,6 g/l
L-leucina	1,5 g/l
Sulfato de ferro · 7H ₂ O	6,0 mg/l
Monoidrato de manganês	4,2 mg/l
Biotina	1,0 mg/l
Tiamina	2,0 mg/l
Ajustado em pH 7,0 com 3 M de água com amônia	

Em primeiro lugar, linhagem de *Corynebacterium glutamicum* TR-CAD1 foi cultivado com agitação por uma noite em 5 ml de meio de fermentação de cadaverina que contém canamicina (25 µg/ml) em tubo de ensaio (antes do cultivo prévio preliminar). O cultivo resultante foi inoculado em 50 ml de meio de produção de cadaverina novo que contém adição de canamicina (25 µg/ml) e cultivado por 24 horas sob temperatura de 30 °C a 180 rpm com amplitude de 30 cm em frasco Sakaguchi de 500 ml (cultivo prévio preliminar). O cultivo prévio preliminar foi inoculado em 2,0 l de meio de fermentação de cadaverina no aparelho de fermentação contínua do tipo de separação de membrana exibido na Fig. 1, tanque de reação de fermentação 1 foi agitado a 800 rpm com agitador 5 a ele fixado, seguido pela regulagem de aeração, controle de temperatura e ajuste de pH do tanque de reação de fermentação 1, enquanto o microorganismo era cultivado por 24 horas (cultivo prévio).

Imediatamente após o término do cultivo prévio, a bomba de circulação de líquido de fermentação 10 foi operada e o microorganismo foi cultivado continuamente sob as condições em que, além das condições de operação no momento do cultivo prévio, tanque de separação de membrana 2 foi aerado, meio de fermentação de cadaverina foi alimentado continuamente e a quantidade de água de permeação de membrana foi regulada de tal forma que a quantidade do líquido de fermentação no aparelho de fermentação contínua tornou-se 2 L, por meio do quê cadaverina foi produzida por fermentação contínua. Neste teste de fermentação contínua, a quantidade de água de permeação de membrana foi regulada e alterada sob as condições de controle de água de permeação de membrana descritas acima, durante o quê a diferença de cabeça d'água foi medida como a diferença de pressão transmembrana com aparelho de regulagem de diferença de cabeça d'água 3. A concentração de ácido láctico produzida no líquido de fermentação de

permeação de membrana e a concentração de glicose residual foram medidas em momento apropriado.

Os resultados no teste de fermentação contínua por 160 horas são exibidos na Tabela 18. A produção estável de cadaverina por meio de fermentação contínua foi viável por meio do método de fabricação de produto químico de acordo com a presente invenção utilizando o aparelho de fermentação contínua do tipo de separação de membrana da Fig. 1. A diferença de pressão transmembrana variou dentro de 2 kPa em todo o período de fermentação contínua.

EXEMPLO 24

PRODUÇÃO DE CADAVERINA POR MEIO DE FERMENTAÇÃO CONTÍNUA (Nº 2)

A produção de cadaverina foi conduzida utilizando o aparelho de fermentação contínua da Fig. 2 e meio de fermentação de cadaverina com a composição exibida na Tabela 17. O meio foi utilizado após esterilização a vapor em alta pressão (121 °C, quinze minutos). Como material de elemento de membrana de separação, utilizou-se moldagem de resina de polissulfona e aço inoxidável. Como membrana de separação, foi utilizada a membrana porosa preparada no Exemplo de Referência 2. A menos que indicado em contrário, as condições de operação deste exemplo são as seguintes:

Capacidade do tanque de reação de fermentação: 2 (L)

Membrana de separação utilizada: membrana de filtração de fluoreto de polivinilideno

Área de filtração eficaz do elemento de separação de membrana:
120 cm²

Controle de temperatura: 30 (°C)

Aeração do tanque de reação de fermentação: 1.5 (l/min) ar

Velocidade de agitação do tanque de reação de fermentação: 800 (rpm)

Ajuste de pH: ajustado em pH 7,0 com 3 M HCl e 3 M de água com amônia

Esterilização: o tanque de cultivo, incluindo o elemento de membrana de separação, e o meio utilizado foram esterilizados com vapor sob
5 alta pressão em autoclave a 121 °C por vinte minutos.

Regulagem da quantidade de água de permeação da membrana: regulagem da velocidade de fluxo por diferença de pressão transmembrana

(do início da fermentação contínua até 100 horas: regulada em 0,1 kPa ou mais a 5 kPa ou menos;

- 10 - 100 horas a 200 horas: regulada em 0,1 kPa ou mais a 2 kPa ou menos; e
- 200 horas a 264 horas: regulada em 0,1 kPa ou mais a 20 kPa ou menos).

Linhagem TR-CAD1 de *Corynebacterium glutamicum* foi utilizada
15 como microorganismo, meio de fermentação de cadaverina que possui a composição exibida na Tabela 7 foi utilizado como meio e a concentração de cadaverina como produto foi medida por meio do método de HPLC. A concentração de glicose foi medida com Teste de Glicose Wako C (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.).

20 Em primeiro lugar, linhagem de *Corynebacterium glutamicum* TR-CAD1 foi cultivada com agitação por uma noite em 5 ml de meio de produção de cadaverina que contém canamicina (25 µg/ml) adicionada em tubo de ensaio (antes do cultivo prévio preliminar). O cultivo resultante foi inoculado em 50 ml de meio de produção de cadaverina novo que contém adição de
25 canamicina (25 µg/ml) cultivado por 24 horas sob temperatura de 30 °C a 180 rpm com amplitude de 30 cm em frasco Sakaguchi de 500 ml (cultivo prévio preliminar).

O cultivo prévio preliminar foi inoculado em 1,5 l de meio de

produção de cadaverina no aparelho de fermentação contínua do tipo de separação de membrana exibido na Fig. 2, tanque de reação de fermentação 1 foi agitado a 800 rpm com agitador 5 a ele fixado, seguido pela regulagem de aeração, controle de temperatura e ajuste de pH do tanque de reação de fermentação 1, enquanto o microorganismo era cultivado por 24 horas (cultivo prévio). Imediatamente após o término do cultivo prévio, o microorganismo foi cultivado continuamente enquanto meio de fermentação de cadaverina foi alimentado continuamente e a quantidade de água de permeação de membrana foi regulada de tal forma que a quantidade do líquido de fermentação no aparelho de fermentação contínua tornou-se 1,5 l, por meio do quê foi produzida cadaverina por meio de fermentação contínua. A regulagem da quantidade de água de permeação de membrana no teste de fermentação contínua foi conduzida por meio de alteração adequada da diferença de cabeça d'água com aparelho de regulagem da diferença de cabeça d'água 3, de tal forma que a diferença de cabeça d'água do tanque de reação de fermentação fosse de até 2 m, ou seja, a diferença de pressão transmembrana foi de até 20 kPa. A concentração de cadaverina produzida no líquido de fermentação de permeação de membrana e a concentração de glicose residual foram medidas em momento apropriado. A velocidade de produção de cadaverina calculada a partir da cadaverina e glicose introduzida é exibida na Tabela 18.

Os resultados no teste de fermentação contínua por 320 horas são exibidos na Tabela 18. A produção estável de cadaverina por meio de fermentação contínua foi viável por meio do método de fabricação de produto químico de acordo com a presente invenção utilizando o aparelho de fermentação contínua da Fig. 2. A diferença de pressão transmembrana variou dentro de 2 kPa em todo o período de fermentação contínua.

EXEMPLO COMPARATIVO 12

PRODUÇÃO DE CADAVERINA POR MEIO DE FERMENTAÇÃO EM BATELADAS

Como forma de fermentação utilizando microorganismo, a maior parte da fermentação em bateladas típica foi conduzida em fermentador de jarra de dois litros para avaliar a sua produtividade de cadaverina. O meio foi utilizado após esterilização a vapor em alta pressão (121 °C, quinze minutos).

- 5 Neste exemplo comparativo, linhagem de *Corynebacterium glutamicum* TR-CAD1 foi utilizada como microorganismo, a concentração de cadaverina na forma de produto foi avaliada por meio do método de HPLC e a concentração de glicose foi medida com Teste de Glicose Wako C (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). As condições de operação do Exemplo Comparativo 8 são as
- 10 seguintes:

Capacidade do tanque de reação de fermentação (quantidade do meio de produção de cadaverina): 1,0 (L)

Controle de temperatura: 35 (°C)

Aeração do tanque de reação de fermentação: 1,5 (l/min) ar

- 15 Velocidade de agitação do tanque de reação de fermentação: 800 (rpm)

Ajuste de pH: ajustado em pH 7,0 com 3 M HCl e 3 M de água com amônia

- Em primeiro lugar, linhagem de *Corynebacterium glutamicum* TR-
- 20 CAD1 foi cultivada com agitação por uma noite em 5 ml de meio de produção de cadaverina que contém canamicina (25 µg/ml) adicionada em tubo de ensaio (cultivo prévio preliminar). O cultivo resultante foi inoculado em 50 ml de meio de produção de cadaverina novo que contém adição de canamicina (25 µg/ml) e cultivado por 24 horas sob temperatura de 30 °C a 180 rpm com
- 25 amplitude de 30 cm em frasco Sakaguchi de 500 ml (cultivo prévio).

O cultivo prévio foi inoculado em 1,0 l de meio de produção de cadaverina (concentração de glicose: 100 g/l) em fermentador de jarra. O microorganismo foi submetido a fermentação em bateladas com o meio de

produção de cadaverina. Os resultados são exibidos na Tabela 18.

TABELA 18

	Exemplo Comparativo 12	Exemplo 23	Exemplo 24
Tempo de fermentação (h)	30	160	144
Glicose introduzida (g)	100	2460	2210
Cadaverina produzida (g)	2.6	60.4	56.2
Glicose não utilizada (g)	0	45	50
Rendimento de cadaverina (g/g)	2,6	2,5	2,5
Velocidade de produção de cadaverina (g/l/h)	0,087	0,200	0,260

Poder-se-á revelar que a velocidade de produção de cadaverina foi significativamente aprimorada pelo método de fabricação de produto químico de acordo com a presente invenção utilizando os aparelhos de fermentação exibidos nas Figs. 1 e 2.

EXEMPLO 25

PRODUÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS POR MEIO DE FERMENTAÇÃO CONTÍNUA (Nº 1)

A produção de ácidos nucleicos foi conduzida utilizando o aparelho de fermentação contínua do tipo separação de membrana da Fig. 1. O meio exibido na Tabela 19 foi utilizado após esterilização a vapor em alta pressão (121 °C, quinze minutos). Como material de elemento de membrana de separação, utilizou-se moldagem de resina de polissulfona e aço inoxidável. Como membrana de separação, foi utilizada a membrana porosa preparada no Exemplo de Referência 2. A menos que indicado em contrário, as condições de operação deste exemplo são as seguintes:

Capacidade do tanque de reação de fermentação: 2 (L)

Membrana de separação utilizada: membrana de filtração de fluoreto de polivinilideno

Área de filtração eficaz do elemento de separação de membrana:

120 cm²;

Controle de temperatura: 30 (°C)

Aeração do tanque de reação de fermentação: 1000 (ml/min)

Velocidade de agitação do tanque de reação de fermentação: 800

5 (rpm)

Esterilização: o tanque de cultivo, incluindo o elemento de membrana de separação, e o meio utilizado, foram esterilizados com vapor sob alta pressão em autoclave a 121 °C por vinte minutos.

Ajuste de pH: ajustado em pH 6,8 com amônia aquosa a 25%

10

Regulagem da quantidade de água de permeação da membrana: regulagem da velocidade de fluxo por diferença de pressão transmembrana

(do início da fermentação contínua até 150 horas: regulada em 0,1 kPa ou mais a 5 kPa ou menos;

- 150 horas a 300 horas: regulada em 0,1 kPa ou mais a 2

15 kPa ou menos; e

- 300 horas a 400 horas: regulada em 0,1 kPa ou mais a 20 kPa ou menos).

Corynebacterium ammoniagenes ATCC 21479 foi utilizado como microorganismo procariótico e meio de fermentação de ácido nucleico que possui a composição exibida na Tabela 19 foi utilizado como meio. As concentrações de guanosina e inosina contidas em líquido de fermentação foram confirmadas por meio de medição das quantidades dos ácidos nucleicos correspondentes por meio de HPLC sob as condições a seguir:

Condições de análise:

25

Coluna: Asahipak GS-220 (7,6 mm de diâmetro interno x 500 mm de comprimento), tampão: 0,2 M de NaH₂PO₄ (pH 3,98) com pH ajustado com ácido fosfórico, temperatura: 55 °C, velocidade de fluxo: 1,5 ml/min, detecção: UV 254 nm, tempo de retenção (min): inosina 16,1, guanosina 20,5.

A concentração de glicose foi medida com Teste de Glicose Wako C (marca registrada) (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.).

TABELA 19**MEIO DE FERMENTAÇÃO DE ÁCIDO NUCLEICO**

		Fermentação em		
		Cultivo prévio	bateladas	Fermentação contínua
Glicose	20	150	150	g/l
Di-hidrogênio fosfato de potássio		10	10	g/l
Hidrogênio fosfato de potássio		10	10	g/l
Sulfato de magnésio		10	10	g/l
Cloreto de cálcio		1	1	g/l
Sulfato de ferro		10	10	mg/l
Sulfato de zinco		1	1	mg/l
Tiamina		5	5	mg/l
Pantotenato de cálcio		10	10	mg/l
Cisteína		20	20	mg/l
Biotina		30	30	µg/l
Uréia		2	2	g/l
Extrato de carne	10	10	10	g/l
Adenina		300	300	mg/l
Hipoxantina		100	100	mg/l
Peptona	10	10	1	g/l
Extrato de levedura	10	10	1	g/l
Cloreto de sódio	3	3	3	g/l

Em primeiro lugar, *Corynebacterium ammoniagenes* ATCC 21479 foi cultivado com agitação em 150 ml do meio de cultivo prévio exibido na Tabela 15 por 24 horas sob temperatura de 30 °C em frasco Sakaguchi (cultivo prévio preliminar). O cultivo prévio preliminar foi inoculado em 1 l de meio de cultivo prévio no aparelho de fermentação contínua do tipo de separação de membrana exibido na Fig. 1, tanque de reação de fermentação 1 foi agitado a 800 rpm com agitador 5 a ele fixado, seguido pela regulagem de aeração e controle de temperatura a 30 °C do tanque de reação 1, enquanto o microorganismo foi cultivado por 24 horas (cultivo prévio). Imediatamente após o término do cultivo prévio, a bomba de circulação de líquido de fermentação foi operada e o microorganismo foi cultivado continuamente sob as condições em que, além das condições de operação no momento do cultivo prévio, o tanque de separação de membrana 2 foi aerado, meio de fermentação contínua foi alimentado continuamente e, após o término do cultivo prévio, o meio de fermentação contínua foi alimentado continuamente, o meio de fermentação foi circulado entre o tanque de reação de fermentação 1 e o tanque de separação de membrana 12 pela bomba de circulação de líquido de fermentação 11 e a quantidade de água de permeação de membrana foi regulada de tal forma que a quantidade do líquido de fermentação no aparelho de fermentação contínua do tipo separação de membrana tornou-se 2 L, por meio do quê ácidos nucleicos foram produzidos por meio de fermentação contínua. Neste teste de fermentação contínua, a quantidade de água de permeação de membrana foi regulada e alterada sob as condições de controle de água de permeação de membrana descritas acima, durante o quê a diferença de cabeça d'água foi medida como a diferença de pressão transmembrana com aparelho de regulagem de diferença de cabeça d'água 3. A concentração de ácidos nucleicos produzida no líquido de fermentação de permeação de membrana e a concentração de glicose residual foram medidas

em momento apropriado. A velocidade de produção de ácidos nucleicos calculada a partir de ácido nucléico e glicose introduzida calculada a partir da concentração de glicose é exibida na Tabela 20.

Como resultado do teste de fermentação por 400 horas, produção estável de ácidos nucleicos por meio de fermentação contínua foi viável por meio do método de fabricação de produto químico de acordo com a presente invenção utilizando o aparelho de fermentação contínua da Fig. 1. A diferença de pressão transmembrana variou dentro de 2 kPa em todo o período de fermentação contínua.

EXEMPLO 26

PRODUÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS POR MEIO DE FERMENTAÇÃO CONTÍNUA (Nº 2)

A produção de ácidos nucleicos foi conduzida utilizando o aparelho de fermentação contínua da Fig. 2. O meio exibido na Tabela 19 foi utilizado após esterilização a vapor em alta pressão (121 °C, quinze minutos).

Como material de elemento de membrana de separação, utilizou-se moldagem de resina de polissulfona e aço inoxidável. Como membrana de separação, foi utilizada a membrana porosa preparada no Exemplo de Referência 2. A menos que indicado em contrário, as condições de operação deste exemplo são as seguintes:

Capacidade do tanque de reação de fermentação: 2 (L)

Membrana de separação utilizada: membrana de filtração de fluoreto de polivinilideno

Área de filtração eficaz do elemento de separação de membrana:

120 cm²;

Controle de temperatura: 30 (°C)

Aeração do tanque de reação de fermentação: 1000 (ml/min)

Velocidade de agitação do tanque de reação de fermentação: 800

(rpm)

Esterilização: o tanque de cultivo, incluindo o elemento de membrana de separação, e o meio utilizado, foram esterilizados com vapor sob alta pressão em autoclave a 121 °C por vinte minutos.

Ajuste de pH: ajustado em pH 6,8 com amônia aquosa a 25%

5 Regulagem da quantidade de água de permeação da membrana: regulagem da velocidade de fluxo por diferença de pressão transmembrana

(do início da fermentação contínua até 150 horas: regulada em 0,1 kPa ou mais a 5 kPa ou menos;

- 150 horas a 300 horas: regulada em 0,1 kPa ou mais a 2
10 kPa ou menos; e
- 300 horas a 400 horas: regulada em 0,1 kPa ou mais a 20 kPa ou menos).

Corynebacterium ammoniagenes ATCC 21479 foi utilizado como microorganismo procariótico e meio de fermentação de ácido
15 nucleico que possui a composição exibida na Tabela 19 foi utilizado como meio. As concentrações de guanosina, inosina e glicose contidas em líquido de fermentação foram confirmadas por meio de medição das quantidades dos ácidos nucleicos correspondentes da mesma forma que no Exemplo 1.

20 Em primeiro lugar, *Corynebacterium ammoniagenes* ATCC 21479 foi cultivado com agitação por 24 horas sob temperatura de 30 °C em 150 ml de meio de cultivo prévio exibido na Tabela 19 em frasco Sakaguchi (cultivo preliminar). O cultivo prévio preliminar foi inoculado em 1 l de meio de cultivo prévio no aparelho de fermentação contínua do tipo de separação
25 de membrana exibido na Fig. 2, tanque de reação de fermentação 1 foi agitado a 800 rpm com agitador 5 a ele fixado, seguido pela regulagem de aeração e controle de temperatura a 30 °C do tanque de reação 1, enquanto o microorganismo foi cultivado por 24 horas (cultivo prévio). Imediatamente

após o término do cultivo prévio, o meio de fermentação contínua foi alimentado continuamente e o microorganismo foi cultivado continuamente enquanto a quantidade de água de permeação de membrana foi regulada de tal forma que a quantidade do líquido de fermentação no aparelho de fermentação contínua tornou-se 1,5 l, por meio do quê foram produzidos ácidos nucleicos por fermentação contínua. Neste teste de fermentação contínua, a quantidade de água de permeação de membrana foi regulada e alterada sob as condições de controle de água de permeação de membrana descritas acima, durante o quê a diferença de cabeça d'água foi medida como a diferença de pressão transmembrana com aparelho de regulação de diferença de cabeça d'água 3. A concentração de ácidos nucleicos produzida no líquido de fermentação de permeação de membrana e a concentração de glicose residual foram medidas em momento apropriado. A velocidade de produção de ácidos nucleicos calculada a partir de ácido nucleico e glicose introduzida calculada a partir da concentração de glicose é exibida na Tabela 20.

Como resultado do teste de fermentação por 400 horas, produção estável de ácidos nucleicos por fermentação contínua foi viável por meio do método de fabricação de produto químico de acordo com a presente invenção utilizando o aparelho de fermentação contínua da Fig. 2. A diferença de pressão transmembrana variou dentro de 2 kPa em todo o período de fermentação contínua.

EXEMPLO COMPARATIVO 13

PRODUÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS POR MEIO DE FERMENTAÇÃO EM BATELADAS

Como forma de fermentação utilizando microorganismo, a maior parte da fermentação em bateladas típica foi conduzida em fermentador de jarra de dois litros para avaliar a sua produtividade de ácido nucleico. O meio de fermentação contínua exibido na Tabela 19 foi

utilizado após esterilização a vapor em alta pressão (121 °C, quinze minutos). Neste exemplo comparativo, *Corynebacterium ammoniagenes* ATCC 21479 foi utilizado como microorganismo procariótico, as concentrações de ácidos nucleicos na forma de produto foram avaliadas por meio do método exibido no Exemplo 21 e a concentração de glicose foi medida com Teste de Glicose Wako C (marca registrada) (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). As condições de operação deste exemplo comparativo são as seguintes:

Capacidade do tanque de reação de fermentação: 2 (L)

Controle de temperatura: 30 (°C)

Aeração do tanque de reação de fermentação: 1000 (ml/min)

Velocidade de agitação do tanque de reação de fermentação: 800 (rpm)

Esterilização: o tanque de cultivo, incluindo o elemento de membrana de separação, e o meio utilizado, foram esterilizados com vapor sob alta pressão em autoclave a 121 °C por vinte minutos.

Ajuste de pH: ajustado em pH 6,8 com amônia aquosa a 25%

Em primeiro lugar, *Corynebacterium ammoniagenes* ATCC 21479 foi cultivado com agitação por 24 horas sob temperatura de 30 °C em 150 ml do meio de cultivo prévio exibido na Tabela 19 em frasco Sakaguchi (cultivo prévio). O cultivo prévio resultante foi inoculado em 1 l do meio de fermentação contínua exibido na Tabela 19 em fermentador de jarra e submetido a fermentação em bateladas. Após o início da fermentação, adicionou-se 5% de glicose de forma a prosseguir com a fermentação. Os resultados de fermentação em bateladas por 120 horas são exibidos na Tabela 20.

TABELA 20

	Exemplo Comparativo 13	Exemplo 25	Exemplo 26
Tempo de fermentação (h)	120	400	400
Glicose introduzida (g)	200	4530	4690
Ácido nucleico formado			
Inosina Guanosina (g)	50 2	906 23	878 23
Glicose não utilizada (g)	0	80	70
Rendimento			
Inosina Guanosina (g/g)	0,25 0,01	0.20 0.005	0.19 0.005
Velocidade de produção (g/l/h) (inosina + guanosina)	0.47	2,3	2,3

Pôde-se revelar que a velocidade de produção de ácidos nucleicos foi significativamente aprimorada pelo método de fabricação de produto químico de acordo com a presente invenção utilizando o aparelho de fermentação exibido nas Figs. 1 e 2.

5

EXEMPLO 27

PRODUÇÃO DE L-TREONINA POR MEIO DE FERMENTAÇÃO CONTÍNUA (Nº 1)

A produção de L-treonina foi conduzida utilizando o aparelho de fermentação contínua do tipo separação de membrana da Fig. 1 e meio de fermentação com a composição exibida na Tabela 21.

10

Em primeiro lugar, é descrito método de avaliação de L-treonina como produto. A quantidade de L-treonina contida em cultivo foi medida por meio do método a seguir. 25 µl de cultivo que contém L-treonina a ser medido foram removidos e receberam em seguida adição de 150 µl de NaHCO₃ (75 mM) e 25 µl de L-metionina padrão interno (2 g/l). Além disso, 900 µl de etanol e 150 µl de DNFB (0,2 M) foram adicionados à solução acima e com ela misturados. A solução resultante foi mantida a 37 °C por uma hora e analisada

15

por meio de HPLC sob as condições a seguir:

Coluna utilizada: CAPCELLPAK C18 TIPO SG120 (Shiseido Co., Ltd.)

5 Fase móvel: 0,1% (p/v) H_3PO_4 : acetonitrila = 7: 3 (velocidade de fluxo 1,2 ml/min)

Detecção: UV (360 nm)

Temperatura: 23 °C

Curva de calibragem foi preparada por meio de análise de amostras de L-treonina com concentração conhecida como amostra e plotagem das suas concentrações de L-treonina sobre a abscissa e a razão de área (razão área de L-treonina/área de L-metionina (padrão interno)) sobre a ordenada. O meio foi utilizado após esterilização a vapor sob alta pressão (121 °C, quinze minutos). Como membrana de separação, foi utilizada a membrana porosa preparada no Exemplo de Referência 2.

15 A menos que indicado em contrário, as condições de operação deste exemplo são as seguintes:

Capacidade de tanque de reação: 2 (L)

Capacidade do tanque de separação de membrana: 0.5 (L)

20 Membrana de separação utilizada: membrana de filtragem de fluoreto de polivinilideno

Área de filtragem eficaz do elemento de separação de membrana: 60 cm²

Controle de temperatura: 37 (°C)

Aeração do tanque de reação: 1,5 (l/min)

25 Aeração do tanque de separação de membrana: 1 (l/min)

Velocidade de agitação do tanque de reação: 800 (rpm)

Ajuste de pH: ajustado em pH 7 com amônia aquosa a 28%

Velocidade de alimentação do meio de fermentação de L-treonina:

controle variável na faixa de 50 a 300 ml/h.

Regulagem da quantidade de água de permeação da membrana:
regulagem da velocidade de fluxo por diferença de pressão transmembrana

(do início da fermentação contínua até 100 horas: regulada em

5 0,1 kPa ou mais a 5 kPa ou menos; e

- 100 horas a 200 horas: regulada em 0,1 kPa ou mais a 2 kPa ou menos).

Em *Providencia rettgeri*, *Providencia rettgeri* SGR 588-77 (FERM P-10528) foi utilizado como o microorganismo que produz L-treonina, meio de fermentação que possui a composição exibida na Tabela 21 foi utilizado como meio, a concentração de L-treonina como produto foi medida por meio do método de HPLC descrito acima e a concentração de glicose foi medida com Teste de Glicose Wako C (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.).

TABELA 21

15

MEIO DE FERMENTAÇÃO DE L-TREONINA

Componentes do meio		Meio de fermentação	Meio de cultivo prévio	Meio adicional em bateladas
Glicose	g/l	120	50	750
Sulfato de amônio	g/l	5	5	-
Di-hidrogênio fosfato de potássio	g/l	1	1	5
Sulfato de magnésio · 7 H ₂ O	g/l	0.4	0.4	2
Sulfato de ferro · 7H ₂ O	ppm	2	2	-
Sulfato de magnésio · 5 H ₂ O	ppm	2	2	-
L-isoleucina	mg/l	10	50	200

Em primeiro lugar *Providencia rettgeri* SGR 588-77 raspado de

meio agar foi inoculado em 100 ml de meio de caldo de glicose (1% de glicose, 3% de caldo (fabricado pela Nissui Co., Ltd.)) em frasco Erlenmeyer de 500 ml e cultivado a 37 °C sob agitação a 140 rpm (cultivo prévio preliminar). O cultivo prévio preliminar foi inoculado em 1,5 l de meio de cultivo prévio (Tabela 21) no

5 aparelho de fermentação contínua do tipo de separação de membrana exibido na Fig. 1, tanque de reação 1 foi agitado a 800 rpm com agitador 5 a ele fixado, seguido pela regulagem de aeração e controle de temperatura a 37 °C do tanque de reação 1, enquanto o microorganismo foi cultivado por 24 horas (cultivo prévio). Imediatamente após o término do cultivo prévio, a bomba de

10 circulação de líquido de fermentação foi operada e o microorganismo foi cultivado continuamente sob as condições em que, além das condições de operação no momento do cultivo prévio, o tanque de separação de membrana 2 foi aerado, meio de fermentação que possui a composição exibida na Tabela 17 foi alimentado continuamente e a quantidade de água de permeação de

15 membrana foi regulada de tal forma que a quantidade do líquido de fermentação no aparelho de fermentação contínua tornou-se 2 L, por meio do quê L-treonina foi produzida por fermentação contínua. Neste teste de fermentação contínua, a quantidade de água de permeação de membrana foi regulada e alterada sob as condições de controle de água de permeação de

20 membrana descritas acima, durante o quê a diferença de cabeça d'água foi medida como a diferença de pressão transmembrana com aparelho de regulagem de diferença de cabeça d'água 3. A concentração de L-treonina produzida no líquido de fermentação de permeação de membrana e a concentração de glicose residual foram medidas em momento apropriado. A

25 diferença de cabeça d'água foi apropriadamente alterada, de tal forma que a cabeça d'água do tanque de reação de fermentação fosse de 2 m ou menos no máximo, ou seja, a diferença de pressão transmembrana estava dentro de 20 kPa. A concentração de L-treonina produzida no líquido de fermentação de

permeação de membrana e a concentração de glicose residual foram medidas em momento apropriado. Os resultados do teste de fermentação contínua por 200 horas são exibidos na Tabela 22.

A produção estável de L-treonina por meio de fermentação contínua foi viável por meio do método de fabricação de produto químico de acordo com a presente invenção utilizando o aparelho de fermentação contínua do tipo de separação da Fig. 1. A diferença de pressão transmembrana variou dentro de 2 kPa em todo o período de fermentação contínua.

EXEMPLO 28

PRODUÇÃO DE L-TREONINA POR MEIO DE FERMENTAÇÃO CONTÍNUA (Nº 2)

A produção de L-treonina foi conduzida utilizando o aparelho de fermentação contínua da Fig. 2 e meio de fermentação com a composição exibida na Tabela 21. O meio foi utilizado após esterilização a vapor em alta pressão (121 °C, quinze minutos). Como material de elemento de membrana de separação, utilizou-se moldagem de resina de polissulfona e aço inoxidável. Como membrana de separação, foi utilizada a membrana porosa preparada no Exemplo de Referência 2. A menos que indicado em contrário, as condições de operação deste exemplo são as seguintes:

Capacidade de tanque de reação: 2 (L)

Membrana de separação utilizada: Membrana de filtração de PVDF

Área de filtração eficaz do elemento de separação de membrana: 120 cm²

Controle de temperatura: 37 (°C)

Aeração do tanque de reação: 1.5 (l/min)

Velocidade de agitação do tanque de reação: 800 (rpm)

Ajuste de pH: ajustado em pH 7 com amônia aquosa a 25%

Velocidade de alimentação do meio de fermentação de L-treonina:

controle variável na faixa de 50 a 300 ml/h.

Regulagem da quantidade de água de permeação da membrana:
regulagem da velocidade de fluxo por diferença de pressão transmembrana

(do início da fermentação contínua até 100 horas: regulada em

5 0,1 kPa ou mais a 5 kPa ou menos; e

- 100 horas a 200 horas: regulada em 0,1 kPa ou mais a 2
kPa ou menos).

- Esterilização: o tanque de cultivo, incluindo o elemento de
membrana de separação, e o meio utilizado, foram esterilizados com vapor sob
10 alta pressão em autoclave a 121 °C por vinte minutos.

Em *Providencia rettgeri*, *Providencia rettgeri* SGR 588-77 (FERM
P-10528) foi utilizado como o microorganismo que produz L-treonina, meio de
fermentação que possui a composição exibida na Tabela 21 foi utilizado como
meio, a concentração de L-treonina como produto foi medida por meio de
15 HPLC exibido no Exemplo 23 e a concentração de glicose foi medida com
Teste de Glicose Wako C (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.).

Em primeiro lugar, *Providencia rettgeri* SGR 588-77 raspado de
meio agar foi inoculado em 100 ml de meio de caldo de glicose (1% de glicose,
3% de caldo (fabricado pela Nissui Co., Ltd.)) em frasco Erlenmeyer de 500 ml.
20 O microorganismo foi cultivado a 37 °C sob agitação a 140 rpm (cultivo prévio
preliminar). O cultivo prévio preliminar foi inoculado em 1,5 l de meio de cultivo
prévio (Tabela 21) no aparelho de fermentação contínua exibido na Fig. 1,
tanque de reação 1 foi agitado a 800 rpm com agitador 5 a ele fixado, seguido
pela regulagem de aeração, controle de temperatura e ajuste de pH do tanque
25 de reação 1, enquanto o microorganismo foi cultivado por 24 horas (cultivo
prévio). Imediatamente após o término do cultivo prévio, o microorganismo foi
cultivado continuamente enquanto meio de fermentação que possui a
composição exibida na Tabela 21 foi alimentado continuamente e a quantidade

de água de permeação de membrana foi regulada de tal forma que a quantidade do líquido de fermentação no aparelho de fermentação contínua tornou-se 1,5 l, por meio do quê foi produzida L-treonina por meio de fermentação contínua. Neste teste de fermentação contínua, a quantidade de
5 água de permeação de membrana foi regulada e alterada sob as condições de controle de água de permeação de membrana descritas acima, durante o quê a diferença de cabeça d'água foi medida como a diferença de pressão transmembrana com aparelho de regulação de diferença de cabeça d'água 3. A concentração de L-treonina produzida no líquido de fermentação de
10 permeação de membrana e a concentração de glicose residual foram medidas em momento apropriado. O rendimento de L-treonina com relação a açúcar e a velocidade de produção de ácido láctico com base na L-treonina e glicose introduzida calculada a partir da concentração de glicose são exibidos na Tabela 18.

15 Como resultado do teste de fermentação por 200 horas, produção estável de L-treonina por meio de fermentação contínua foi viável por meio do método de fabricação de produto químico de acordo com a presente invenção utilizando o aparelho de fermentação contínua da Fig. 2. A diferença de pressão transmembrana variou dentro de 2 kPa em todo o período de
20 fermentação contínua.

EXEMPLO COMPARATIVO 14

PRODUÇÃO DE L-TREONINA POR MEIO DE FERMENTAÇÃO EM BATELADAS

Como forma de fermentação utilizando microorganismo, a maior parte da fermentação em bateladas típica foi conduzida em fermentador de
25 jarra de dois litros para avaliar a sua produtividade de L-treonina. O meio de cultivo prévio exibido na Tabela 21 foi utilizado como meio ao iniciar-se o cultivo em bateladas. Estes meios foram utilizados após esterilização a vapor em alta pressão (121 °C, quinze minutos). Neste exemplo comparativo,

Providencia rettgeri SGR 588-77 foi utilizada como microorganismo e as concentrações de L-treonina e glicose contidas no líquido de fermentação foram medidas por meio do método exibido no Exemplo 27. As condições de operação deste exemplo comparativo são as seguintes:

5 Capacidade do tanque de reação de fermentação (quantidade do meio de fermentação de L-treonina): 1 (L)

Controle de temperatura: 37 (°C)

Aeração do tanque de reação de fermentação: 1 (l/min)

10 Velocidade de agitação do tanque de reação de fermentação: 800 (rpm)

Ajuste de pH: ajustado em pH 7 com amônia aquosa a 28%

Em primeiro lugar, *Providencia rettgeri* SGR 588-77 raspado de meio agar foi inoculado em 90 ml de meio de caldo de glicose (1% de glicose, 3% de caldo (fabricado pela Nissui Co., Ltd.)) em frasco Erlenmeyer de 500 ml.

15 O microorganismo foi cultivado a 37 °C sob agitação a 140 rpm (cultivo prévio). O cultivo prévio foi inoculado em 810 ml do meio de cultivo prévio exibido na Tabela 17 em fermentador de minijarra e submetido a fermentação em bateladas. A composição de meio adicionada durante o cultivo é exibida em meio adicional na Tabela 9. O meio foi adicionado em 24, 32, 40 e 48 horas

20 após o início de cultivo em quantidade de 50 ml, respectivamente. Os resultados de fermentação em bateladas são exibidos na Tabela 22.

TABELA 22

	Exemplo Comparativo 14	Exemplo 27	Exemplo 28
Tempo de fermentação (h)	55	200	200
Glicose introduzida (g)	195	2350	2290
L-treonina formada (g)	67.3	766	727

	Exemplo Comparativo 14	Exemplo 27	Exemplo 28
Glicose não utilizada (g)	0	98	87
Rendimento (g/g)	0,345	0,34	0,33
Velocidade de produção (g/l/h)	1,11	1,9	2,5

Poder-se-á revelar que a velocidade de produção de L-treonina foi significativamente aprimorada pelo método de fabricação de produto químico de acordo com a presente invenção utilizando o aparelho de fermentação exibido nas Figs. 1 e 2.

5

EXEMPLO 29

PRODUÇÃO DE ÁCIDO L-LÁCTICO POR MEIO DE FERMENTAÇÃO CONTÍNUA

UTILIZANDO BACTÉRIA DE ÁCIDO LÁCTICO (Nº 1)

A produção de ácido L-láctico foi conduzida utilizando o aparelho de fermentação contínua do tipo separação de membrana da Fig. 1. O meio de fermentação de ácido láctico por bactérias de ácido láctico exibido na Tabela 23 foi utilizado após esterilização a vapor em alta pressão (121 °C, quinze minutos). Como membrana de separação, foi utilizada a membrana porosa preparada no Exemplo de Referência 2. A menos que indicado em contrário, as condições de operação deste exemplo são as seguintes:

15

Capacidade do tanque de reação de fermentação: 2 (L)

Membrana de separação utilizada: membrana de filtração de fluoreto de polivinilideno

Área de filtração eficaz do elemento de separação de membrana: 120 cm²

20

Controle de temperatura: 37 (°C)

Aeração do tanque de reação de fermentação: 50 (ml/min) nitrogênio

Velocidade de agitação do tanque de reação de fermentação: 600 (rpm)

Esterilização: o tanque de cultivo, incluindo o elemento de membrana de separação, e o meio utilizado foram esterilizados com vapor sob alta pressão em autoclave a 121 °C por vinte minutos.

Ajuste de pH: ajustado em pH 6,5 com 8 N de amônia aquosa

Regulagem da quantidade de água de permeação da membrana: regulagem da velocidade de fluxo por diferença de pressão transmembrana

(do início da fermentação contínua até 150 horas: regulada em

0,1 kPa ou mais a 5 kPa ou menos;

- 150 horas a 300 horas: regulada em 0,1 kPa ou mais a 2 kPa ou menos; e

- 300 horas a 400 horas: regulada em 0,1 kPa ou mais a 20 kPa ou menos).

Linhagem de *Lactococcus lactis* JCM 7638 foi utilizada como microorganismo procariótico e meio de fermentação de ácido láctico por bactérias de ácido láctico que possui a composição exibida na Tabela 23 foi utilizado como meio. A concentração de ácido L-láctico contida em líquido de fermentação foi avaliada por meio do mesmo método do Exemplo de Referência 1. A concentração de glicose foi medida com Teste de Glicose Wako C (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.).

TABELA 23

MEIO DE FERMENTAÇÃO DE ÁCIDO LÁCTICO POR BACTÉRIAS LÁCTEAS

Glicose	60 g/l
Extrato de levedura	5 g/l
Polipeptona	5 g/l
Cloreto de sódio	5 g/l

Em primeiro lugar, linhagem de *Lactococcus lactis* JCM 7638 foi cultivada de forma estática em 5 ml do meio de fermentação de ácido láctico purgado com gás nitrogênio exibido na Tabela 23 por 24 horas sob temperatura de 37 °C em tubo de ensaio (antes do cultivo prévio preliminar). O cultivo resultante foi inoculado em 50 ml de meio de fermentação de ácido láctico purgado com gás nitrogênio novo e cultivado de forma estática por 48 horas a 37 °C (cultivo prévio preliminar). O cultivo prévio preliminar foi inoculado em 1,5 l de meio de fermentação de ácido láctico purgado com gás nitrogênio no aparelho de fermentação contínua do tipo de separação de membrana exibido na Fig. 1, tanque de reação de fermentação 1 foi agitado a 600 rpm com agitador 5 a ele fixado, seguido pela regulação de aeração e controle de temperatura a 37 °C do tanque de reação 1, enquanto o microorganismo foi cultivado por 24 horas (cultivo prévio). Imediatamente após o término do cultivo prévio, o microorganismo foi cultivado continuamente em meio de fermentação de ácido láctico alimentado continuamente enquanto a quantidade de água de permeação de membrana foi regulada de tal forma que a quantidade do líquido de fermentação no aparelho de fermentação contínua tornou-se 2 l, por meio do quê foi produzido ácido L-láctico por meio de fermentação contínua. Nesse momento, gás nitrogênio foi alimentado de aparelho de alimentação de gás para o tanque de reação de fermentação e o gás descarregado foi recuperado e novamente alimentado para o tanque de reação de fermentação. Isso significa que o gás que contém gás nitrogênio foi fornecido por meio de reciclagem. Neste teste de fermentação contínua, a quantidade de água de permeação de membrana foi regulada e alterada sob as condições de controle de água de permeação de membrana descritas acima, durante o quê a diferença de cabeça d'água foi medida como a diferença de pressão transmembrana com aparelho de regulação de diferença de cabeça d'água 3. A concentração de ácido L-láctico produzida no líquido de fermentação de

permeação de membrana e a concentração de glicose residual foi medida em momento apropriado. O rendimento de ácido L-láctico com relação a açúcar e a velocidade de produção de ácido L-láctico calculada a partir do ácido L-láctico e glicose introduzida calculada a partir da concentração de glicose são exibidos na Tabela 24.

Como resultado do teste de fermentação por 400 horas, produção estável de ácido L-láctico por meio de fermentação contínua foi viável por meio do método de fabricação de produto químico de acordo com a presente invenção utilizando o aparelho de fermentação contínua do tipo de separação de membrana. A diferença de pressão transmembrana variou dentro de 2 kPa em todo o período de fermentação contínua.

EXEMPLO 30

PRODUÇÃO DE ÁCIDO L-LÁCTICO POR MEIO DE FERMENTAÇÃO CONTÍNUA

UTILIZANDO BACTÉRIA DE ÁCIDO LÁCTICO (Nº 2)

A produção de ácido L-láctico foi conduzida utilizando o aparelho de fermentação contínua da Fig. 2. Como meio, o meio de fermentação de ácido láctico por bactérias de ácido láctico exibido na Tabela 23 foi utilizado após esterilização a vapor em alta pressão (121 °C, quinze minutos). O meio foi utilizado após esterilização a vapor em alta pressão (121 °C, quinze minutos). Como membrana de separação, foi utilizada a membrana porosa preparada no Exemplo de Referência 2. A menos que indicado em contrário, as condições de operação deste exemplo são as seguintes:

Capacidade do tanque de reação de fermentação: 2 (L)

Membrana de separação utilizada: membrana de filtração de fluoreto de polivinilideno

Área de filtração eficaz do elemento de separação de membrana: 120 cm²

Controle de temperatura: 37 (°C)

Aeração do tanque de reação de fermentação: 50 (ml/min)
nitrogênio

Velocidade de agitação do tanque de reação de fermentação: 600
(rpm)

- 5 Esterilização: o tanque de cultivo, incluindo o elemento de membrana de separação, e o meio utilizado, foram esterilizados com vapor sob alta pressão em autoclave a 121 °C por vinte minutos.

Ajuste de pH: ajustado em pH 6,5 com 8 N de amônia aquosa

- Regulagem da quantidade de água de permeação da membrana:
10 regulagem da velocidade de fluxo por diferença de pressão transmembrana
(do início da fermentação contínua até 150 horas: regulada em 0,1 kPa ou mais a 5 kPa ou menos;

- 150 horas a 300 horas: regulada em 0,1 kPa ou mais a 2 kPa ou menos; e

- 15 - 300 horas a 400 horas: regulada em 0,1 kPa ou mais a 20 kPa ou menos).

- Linhagem de *Lactococcus lactis* JCM 7638 foi utilizada como microorganismo procariótico e cultivada da mesma forma que no Exemplo 29 até o cultivo prévio. Imediatamente após o término do cultivo prévio, o
20 microorganismo foi cultivado continuamente em meio alimentado continuamente enquanto a quantidade de água de permeação de membrana foi regulada de tal forma que a quantidade do líquido de fermentação no aparelho de fermentação contínua tornou-se 1,5 l, por meio do quê foi produzido ácido L-láctico por fermentação contínua. Nesse momento, gás nitrogênio foi
25 alimentado de aparelho de alimentação de gás para o tanque de reação de fermentação e o gás descarregado foi recuperado e novamente alimentado para o tanque de reação de fermentação. Isso significa que o gás que contém gás nitrogênio foi fornecido por meio de reciclagem. Neste teste de

fermentação contínua, a quantidade de água de permeação de membrana foi regulada e alterada sob as condições de controle de água de permeação de membrana descritas acima, durante o quê a diferença de cabeça d'água foi medida como a diferença de pressão transmembrana com aparelho de
5 regulagem de diferença de cabeça d'água 3. A concentração de ácido L-láctico produzida no líquido de fermentação de permeação de membrana e a concentração de glicose residual foram medidas em momento apropriado. O rendimento de ácido L-láctico com relação a açúcar calculado a partir do ácido L-láctico e glicose introduzida calculada a partir da concentração de glicose e a
10 velocidade de produção de ácido L-láctico são exibidos na Tabela 24.

Como resultado do teste de fermentação por 400 horas, produção estável de ácido L-láctico por meio de fermentação contínua foi viável por meio do método de fabricação de produto químico de acordo com a presente invenção utilizando o aparelho de fermentação contínua da Fig. 2. A diferença
15 de pressão transmembrana variou dentro de 2 kPa em todo o período de fermentação contínua.

EXEMPLO COMPARATIVO 15

PRODUÇÃO DE ÁCIDO L-LÁCTICO POR MEIO DE FERMENTAÇÃO EM BATELADAS

Como forma de fermentação utilizando microorganismo, a maior
20 parte da fermentação em bateladas típica foi conduzida em fermentador de jarra de dois litros para avaliar a sua produtividade de ácido L-láctico. O meio exibido na Tabela 23 foi utilizado após esterilização a vapor em alta pressão (121 °C, quinze minutos). Neste exemplo comparativo, linhagem de *Lactococcus lactis* JCM7638 foi utilizada como microorganismo procariótico e a
25 concentração de ácido L-láctico como produto foi avaliada por meio do método exibido no Exemplo de Referência 1. A concentração de glicose foi medida com Teste de Glicose Wako C (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). As condições de operação deste exemplo comparativo são as seguintes:

Capacidade do tanque de reação de fermentação: 1 (L)

Controle de temperatura: 37 (°C)

Aeração do tanque de reação de fermentação: 50 (ml/min)

nitrogênio

5 Velocidade de agitação do tanque de reação de fermentação: 200 (rpm)

Ajuste de pH: ajustado em pH 6,5 com 8 N de amônia aquosa

Em primeiro lugar, linhagem de *Lactococcus lactis* JCM 7638 foi cultivada de forma estática em 5 ml do meio de fermentação de ácido láctico purgado com gás nitrogênio exibido na Tabela 23 por 24 horas sob temperatura de 37 °C (cultivo prévio preliminar). O cultivo resultante foi inoculado em 50 ml de meio de fermentação de ácido láctico purgado com gás nitrogênio novo e cultivado de forma estática por 48 horas sob temperatura de 37 °C (cultivo prévio). O cultivo prévio resultante foi inoculado em 1 l do meio de fermentação
10 contínua/em bateladas exibido na Tabela 23 em fermentador de jarra e submetido a fermentação em bateladas. Os resultados de fermentação em bateladas são exibidos na Tabela 24.

TABELA 24

	Exemplo Comparativo 15	Exemplo 29	Exemplo 30
Tempo de fermentação (h)	40	400	400
Glicose introduzida (g)	90	4460	3550
Ácido L-láctico formado (g)	83	3920	3060
Glicose não utilizada (g)	0	60	70
Rendimento (g/g)	0.92	0.89	0.88
Velocidade de produção (g/l/h)	2.1	4.9	5.1

Poder-se-á revelar que a velocidade de produção de ácido L-

lático foi significativamente aprimorada pelo método de fabricação de produto químico de acordo com a presente invenção utilizando o aparelho de fermentação exibido nas Figs. 1 e 2.

EXEMPLO DE REFERÊNCIA 6

5 PREPARAÇÃO DE DNA CROMOSSÔMICO DE LINHAGEM DE *BACILLUS LAEVOLACTICUS* JCM2513

Linhagem de *Bacillus laevolacticus* JCM2513 foi inoculada em 100 ml de meio GYP (meio GYP descrito em JP-A nº 2003-088392) e cultivada sob temperatura de 30 °C por 24 horas para obter cultivo. O cultivo resultante
10 foi centrifugado a 3000 rpm por quinze minutos para obter 0,5 g de microorganismo umedecido e, a partir do microorganismo umedecido, DNA cromossômico foi obtido por meio de método de Saito e Miura (*Biochem. Biophys. Acta.*, 72, 619 (1963)). Em seguida, 60 µg do DNA cromossômico e 3 U de enzima de restrição Sau3AI foram misturados em 10 mM de tampão Tris-HCl (50 mM de NaCl, 10 mM de MgSO₄ e 1 mM de ditioneitol (pH 7,4)) e
15 reagidos sob temperatura de 37 °C por trinta minutos. A solução de reação foi extraída com fenol e precipitada com etanol de forma habitual para obter 50 µg de fragmento de DNA cromossômico digerido por Sau3AI de linhagem de *Bacillus laevolacticus* JCM2513.

20 EXEMPLO DE REFERÊNCIA 7

PREPARAÇÃO DE BIBLIOTECA DE GENES DE LINHAGEM JCM2513 DE *BACILLUS LAEVOLACTICUS* UTILIZANDO DNA DE VETOR DE PLASMÍDEO

20 µg de DNA de vetor de plasmídeo (pUC19) capaz de reprodução autônoma em *Escherichia coli* e 200 U de enzima de restrição
25 BamHI foram misturados em 50 mM de tampão Tris-HCl (que contém 100 mM de NaCl, 10 mM de sulfato de magnésio (pH 7,4)) e reagiram sob temperatura de 37 °C por duas horas para obter solução de digestão e a solução de digestão foi extraída com fenol e precipitada com etanol de forma habitual.

Em seguida, o fragmento de DNA derivado de vetor de plasmídeo foi desfosforilado por meio de tratamento com fosfatase álcali bacteriana para evitar nova união, extraído com fenol e precipitado com etanol de forma habitual.

5 1 µg deste pUC19 digerido com BamHI e 1 µg do fragmento de DNA cromossômico de linhagem de *Bacillus laevolacticus* JCM 2513 digerida com Sau3AI, obtido no Exemplo de Referência 3, e 2 U de T4 DNA ligase (fabricada pela Takara Shuzo Co., Ltd.) foram adicionados a 66 mM de tampão Tris-HCl (pH 7,5) que contém 66 mM de cloreto de magnésio, 10 mM de ditiotritol e 10 mM de ATP e reagiram sob temperatura de 16 °C por dezesseis
10 horas para ligar os DNAs. Em seguida, a mistura de DNA resultante foi utilizada de forma habitual para transformar *Escherichia coli* JM109 que foi colocado em placas em seguida sobre meio LB agar contendo 50 µg/ml de ampicilina sódio, para obter cerca de vinte mil colônias para uso como biblioteca genética. Das
15 cerca de vinte mil colônias, foi recuperado DNA recombinante. O método de recuperação seguiu-se ao método de Saito & Miura descrito acima.

EXEMPLO DE REFERÊNCIA 8

PREPARAÇÃO DE HOSPEDEIRO PARA SELEÇÃO DE GENE D-LACTATO

DESIDROGENASE

20 Seleção de gene D-LDH de linhagem JCM2513 de *Bacillus laevolacticus* foi conduzida por meio de complementação funcional. O princípio é descrito em detalhes em Dominique, G., *Appl. Environ. Microbiol.*, Estados Unidos (1995), 61 266-272. Isso significa que é necessário preparar linhagem de *Escherichia coli* com deficiência na atividade de D-lactato desidrogenase e
25 na atividade de piruvato formato-liase. Linhagem de *Escherichia coli* tornada deficiente por meio da destruição de gene D-lactato desidrogenase (ldhA) e gene de piruvato formato-liase (pflB e pflD) foi preparada por meio de método de Kirill et al (Kirill, A., *PNAS*, Estados Unidos (2000) 97 6640-6645). A

linhagem preparada desta forma foi denominada linhagem TM33 (*E. coli* Δ ldhA Δ pflB::Km^r Δ pflD::Cm^r) e utilizada como hospedeiro para a seleção de gene D-lactato desidrogenase.

EXEMPLO DE REFERÊNCIA 9

5

SELEÇÃO DE GENE D-LACTATO DESIDROGENASE

Linhagem TM33 de *Escherichia coli* foi inoculada em 100 ml de meio LB que contém 50 µg/ml de sulfato de canamicina e 15 µg/ml de cloranfenicol e cultivada sob temperatura de 37 °C por 24 horas para obter cultivo. O cultivo obtido desta forma foi centrifugado a 3000 rpm por quinze minutos para obter 0,8 g de microorganismo úmido. O microorganismo úmido obtido foi lavado por três vezes com 10 ml de glicerol a 10% e suspenso em seguida em 0,1 ml de glicerol a 10% para obter células competentes. 1 µl da biblioteca genética derivada de linhagem de *Bacillus laevolacticus* JCM2513 obtida no Exemplo de Referência 8 foi adicionado e introduzido de forma habitual por meio de eletroporação às células competentes e as linhagens resultantes foram colocadas sobre meio agar M9GP (meio M9 + 0,4% glicose + 0,2% peptona) que contém 50 µg/ml de ampicilina sódio para obter diversas linhagens capazes de cultivo sob condições anaeróbicas.

EXEMPLO DE REFERÊNCIA 10

20

ANÁLISE DE SEQÜÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS DE DNA QUE CONTÉM O GENE D-LACTATO DESIDROGENASE

A partir da linhagem de *Escherichia coli* TM33/pBL2 que contém o DNA recombinante obtido acima, foi preparado plasmídeo de forma habitual e o DNA recombinante resultante foi utilizado em seqüenciamento de nucleotídeos. Seqüenciamento de nucleotídeos foi conduzido de acordo com o método de Sanger utilizando Kit de Seqüenciamento de Ciclos de Término Taq DyeDeoxy (fabricado pela Applied Biochemical). A seqüência de nucleotídeos resultante do DNA que contém o gene D-lactato desidrogenase foi de 2995 pares de

bases. Conduziu-se pesquisa de quadro de leitura aberta para esta sequência e sequência de DNA (SEQ ID Nº 10) do gene D-lactato desidrogenase com 1011 bp foi determinada temporariamente utilizando Genetyx (fabricado pela Software Kaihatsu Co., Ltd.).

5

EXEMPLO DE REFERÊNCIA 11

PREPARAÇÃO DE VETOR DE EXPRESSÃO PARA GENE D-LACTATO DESIDROGENASE

Gene D-LDH foi clonado de *Bacillus laevolacticus*. O gene D-LDH foi clonado por meio de PCR e introduzido da mesma forma em vetor de expressão. O método de clonagem é descrito abaixo.

10

Bacillus laevolacticus foi cultivado e recuperado em seguida por meio de centrifugação, seguido por extração de DNA de genoma com Kit de Isolamento de DNA Microbiano UltraClean (fabricado pela MO BIO). A operação específica seguiu o protocolo ligado ao kit. O DNA de genoma resultante foi utilizado em seguida como modelo em PCR. O DNA obtido acima foi utilizado como modelo na clonagem de gene D-LDH por meio de PCR. Na reação de amplificação por PCR, utilizou-se KOD-Plus-polimerase (fabricada pela Toyobo) estimada como possuindo precisão de cinquenta vezes com relação a Taq. O tampão de reação, mistura de dNTP etc. utilizados foram os ligados ao kit. Primers de amplificação de gene D-LDH (SEQ ID Nº 11 e 12) foram preparados de tal forma que sequência de reconhecimento de XhoI e sequência de reconhecimento de NotI foram adicionadas aos lados 5 e 3-terminais, respectivamente.

15

20

Cada fragmento de amplificação de PCR foi purificado, fosforilado em seguida no seu término com T4 polinucleotídeo quinase (fabricada pela TAKARA) e ligado a vetor pUC118 (que havia sido tratado por meio de divisão com enzima de restrição HincII e submissão em seguida da superfície de divisão a desfosforilação). Esta ligação foi conduzida com kit de ligação de DNA Ver. 2 (fabricado pela TAKARA). O produto de ligação foi utilizado para

transformar *Escherichia coli* DH5 α do qual DNA de plasmídeo foi recuperado em seguida para obter plasmídeo em que cada gene D-LDH havia sido subclonado. O vetor pUC118 resultante no qual o gene D-LDH havia sido inserido foi digerido com enzimas de restrição XhoI e NotI e cada um dos
 5 fragmentos de DNA resultantes foi inserido em local de divisão de XhoI/NotI de vetor de expressão de levedura pTRS11 (Fig. 5). O vetor de expressão de gene D-LDH preparado desta forma foi denominado pTM63.

EXEMPLO DE REFERÊNCIA 12

INTRODUÇÃO DO VETOR DE EXPRESSÃO DE GENE D-LDH EM LEVEDURA

pTM63 obtido no Exemplo de Referência 11 foi transformado em
 10 linhagem de levedura *Saccharomyces cerevisiae* NBRC 10505. Esta transformação foi conduzida por meio do método de acetato de lítio utilizando Sistema de Transformação de Levedura YEASTMAKER (fabricado pela CLONTECH). A operação específica seguiu o protocolo ligado ao kit. A
 15 linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* NBRC 10505 utilizada como hospedeiro é linhagem com deficiência na capacidade de produção de uracil e o seu transformador ao qual havia sido introduzido pTM63 pode ser selecionado sobre meio livre de uracil pela função de gene URA3 possuída por pTM63.

20 A introdução do vetor de expressão de gene D-LDH no transformador obtido desta forma foi confirmada por meio da extração de DNA de genoma que contém DNA de plasmídeo por meio de kit de extração de DNA de genoma Gentrukun (fabricado pela TAKARA) e utilização em seguida do DNA de genoma como modelo em PCR com Mistura Prévia de Taq (fabricada
 25 pela TAKARA). Como primer, foi utilizado o primer empregado na clonagem do gene D-LDH. Como resultado, confirmou-se que todos os transformadores continham gene D-LDH neles introduzido.

Linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* NBRC 10505 na qual

havia sido introduzido pTM63 é designada a seguir linhagem NBRC 10505/pTM63.

EXEMPLO 31

PRODUÇÃO DE ÁCIDO D-LÁCTICO POR MEIO DE FERMENTAÇÃO CONTÍNUA (Nº 1)

5 A produção de ácido L-láctico foi conduzida utilizando o aparelho de fermentação contínua do tipo separação de membrana da Fig. 1 e meio de produção de ácido D-láctico que possui a composição exibida na Tabela 25. O meio foi utilizado após esterilização a vapor em alta pressão (121 °C, quinze minutos). Como material de elemento de membrana de separação, utilizou-se
10 moldagem de resina de polissulfona e aço inoxidável. Como membrana de separação, foi utilizada a membrana porosa preparada no Exemplo de Referência 2. A menos que indicado em contrário, as condições de operação deste exemplo são as seguintes:

Capacidade do tanque de reação de fermentação: 2,0 (L)

15 Membrana de separação utilizada: membrana de filtração de PVDF

Área de filtração eficaz do elemento de separação de membrana:
120 cm²

Controle de temperatura: 30 (°C)

20 Aeração do tanque de reação de fermentação: 0.2 (l/min) ar

Velocidade de agitação do tanque de reação de fermentação: 800 (rpm)

Ajuste de pH: ajustado em pH 5,0 com 5 N NaOH

25 Esterilização: o tanque de cultivo, incluindo o elemento de membrana de separação, e o meio utilizado foram esterilizados com vapor sob alta pressão em autoclave a 121 °C por vinte minutos.

Regulagem da quantidade de água de permeação da membrana:
regulagem da velocidade de fluxo por diferença de pressão transmembrana

(do início da fermentação contínua até 100 horas: regulada em 0,1 kPa ou mais a 5 kPa ou menos;

- 100 horas a 200 horas: regulada em 2 kPa ou menos; e
- 200 horas a 320 horas: regulada em 0,1 kPa ou mais a 20

5 kPa ou menos).

Linhagem NBRC10505/pTM63 foi utilizada como microorganismo, meio de produção de ácido D-láctico que possui a composição exibida na Tabela 25 foi utilizado como meio e a concentração de ácido D-láctico como produto foi medida por meio do mesmo método de HPLC do Exemplo de Referência 1. A concentração de glicose foi medida com Teste de Glicose Wako C (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.).

TABELA 25

MEIO DE FERMENTAÇÃO DE ÁCIDO LÁCTICO DE LEVEDURA

Glicose	100 g
Base de nitrogênio de levedura sem aminoácido (Difco)	6,7 g
Padrão 19 aminoácidos excluindo leucina	152 mg
Leucina	760 mg
Inositol	152 mg
Ácido p-aminobenzóico	16 mg
Adenina	40 mg
Unidade (1/litro)	

Em primeiro lugar, a linhagem de NBRC10505/pTM63 foi cultivada com agitação por uma noite em 5 ml de meio de produção de ácido D-láctico em tubo de ensaio (antes do cultivo prévio preliminar). O cultivo resultante foi inoculado em 50 ml de meio de produção de ácido D-láctico novo

e cultivado com agitação por 24 horas sob temperatura de 30 °C em frasco Sakaguchi de 500 ml (cultivo prévio preliminar). O cultivo prévio preliminar foi inoculado em 2,0 l de meio de produção de ácido D-láctico no aparelho de fermentação contínua do tipo de separação de membrana exibido na Fig. 1, tanque de reação de fermentação 1 foi agitado a 800 rpm com agitador 5 a ele fixado, seguido pela regulação de aeração, controle de temperatura e ajuste de pH do tanque de reação 1 e o microorganismo foi cultivado por 24 horas (cultivo prévio).

Imediatamente após o término do cultivo prévio, a bomba de circulação de líquido de fermentação 10 foi operada e o microorganismo foi cultivado continuamente sob as condições em que, além das condições de operação no momento do cultivo prévio, tanque de separação de membrana 2 foi aerado, meio de fermentação de ácido D-láctico foi alimentado continuamente e a quantidade de água de permeação de membrana foi regulada de tal forma que a quantidade do líquido de fermentação no aparelho de fermentação contínua do tipo separação de membrana tornou-se 2 l, por meio do quê cadaverina foi produzida por meio de fermentação contínua. Neste teste de fermentação contínua, a quantidade de água de permeação de membrana foi regulada e alterada sob as condições de controle de água de permeação de membrana descritas acima, durante o quê a diferença de cabeça d'água foi medida como a diferença de pressão transmembrana com aparelho de regulação de diferença de cabeça d'água 3. A concentração de ácido láctico produzida no líquido de fermentação de permeação de membrana e a concentração de glicose residual foram medidas em momento apropriado. Os resultados no teste de fermentação contínua por 320 horas são exibidos na Tabela 26.

A produção estável de ácido D-láctico por meio de fermentação contínua foi viável por meio do método de fabricação de produto químico de

acordo com a presente invenção utilizando o aparelho de fermentação contínua do tipo de separação de membrana. A diferença de pressão transmembrana variou dentro de 2 kPa em todo o período de fermentação contínua.

EXEMPLO 32

5 PRODUÇÃO DE ÁCIDO D-LÁCTICO POR MEIO DE FERMENTAÇÃO CONTÍNUA (Nº 2)

A produção de ácido D-láctico foi conduzida utilizando o aparelho de fermentação contínua da Fig. 2 e meio de produção de ácido D-láctico que possui a composição exibida na Tabela 25. O meio foi utilizado após esterilização a vapor em alta pressão (121 °C, quinze minutos). Como material
10 de elemento de membrana de separação, utilizou-se moldagem de resina de polissulfona e aço inoxidável. Como membrana de separação, foi utilizada a membrana porosa preparada no Exemplo de Referência 2. A menos que indicado em contrário, as condições de operação deste exemplo são as seguintes:

- 15 Capacidade do tanque de reação de fermentação: 1,5 (L)
- Membrana de separação utilizada: membrana de filtração de fluoreto de polivinilideno
- Área de filtração eficaz do elemento de separação de membrana:
120 cm²
- 20 Controle de temperatura: 30 (°C)
- Aeração do tanque de reação de fermentação: 0,2 (l/min) ar
- Velocidade de agitação do tanque de reação de fermentação: 800
(rpm)
- Ajuste de pH: ajustado em pH 5,0 com 5 N NaOH
- 25 Esterilização: o tanque de cultivo, incluindo o elemento de membrana de separação, e o meio utilizado, foram esterilizados com vapor sob alta pressão em autoclave a 121 °C por vinte minutos.
- Regulagem da quantidade de água de permeação da membrana:

regulagem da velocidade de fluxo por diferença de pressão transmembrana

(do início da fermentação contínua até 90 horas: regulada em 0,1 kPa ou mais a 5 kPa ou menos;

- 90 horas a 180 horas: regulada em 0,1 kPa ou mais a 2 kPa ou menos; e
- 180 horas a 264 horas: regulada em 0,1 kPa ou mais a 20 kPa ou menos).

Linhagem NBRC10505/pTM63 foi utilizada como microorganismo, meio de produção de ácido D-láctico que possui a composição exibida na Tabela 25 foi utilizado como meio e a concentração de ácido D-láctico como produto foi medida por meio do mesmo método de HPLC do Exemplo de Referência 1. A concentração de glicose foi medida com Teste de Glicose Wako C (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.).

Em primeiro lugar, a linhagem de NBRC10505/pTM63 foi cultivada com agitação por uma noite em 5 ml de meio de produção de ácido D-láctico em tubo de ensaio (antes do cultivo prévio preliminar). O cultivo resultante foi inoculado em 50 ml de meio de produção de ácido D-láctico novo e cultivado com agitação por 24 horas sob temperatura de 30 °C em frasco Sakaguchi de 500 ml (cultivo prévio preliminar).

O cultivo prévio preliminar foi inoculado em 1,5 l de meio de produção de ácido D-láctico no aparelho de fermentação contínua exibido na Fig. 2, tanque de reação de fermentação 1 foi agitado a 800 rpm com agitador 5 a ele fixado, seguido pela regulagem de aeração, controle de temperatura e ajuste de pH do tanque de reação de fermentação 1, enquanto o microorganismo foi cultivado por 24 horas (cultivo prévio). Imediatamente após o término do cultivo prévio, o microorganismo foi cultivado continuamente enquanto meio de produção de ácido D-láctico era alimentado continuamente e a quantidade de água de permeação de membrana foi regulada de tal forma

que a quantidade do líquido de fermentação no aparelho de fermentação contínua se tornasse 1,5 l, por meio do quê foi produzido ácido D-láctico por fermentação contínua. Neste teste de fermentação contínua, a quantidade de água de permeação de membrana foi regulada e alterada sob as condições de controle de água de permeação de membrana descritas acima, durante o quê a diferença de cabeça d'água foi medida como a diferença de pressão transmembrana com aparelho de regulação de diferença de cabeça d'água 3. A concentração de ácido D-láctico produzida no líquido de fermentação de permeação de membrana e a concentração de glicose residual foram medidas em momento apropriado. A velocidade de produção de ácido D-láctico calculada a partir do ácido D-láctico e glicose introduzida é exibida na Tabela 26.

Como resultado do teste de fermentação por 264 horas, produção estável de ácido D-láctico por meio de fermentação contínua foi viável por meio do método de fabricação de produto químico de acordo com a presente invenção utilizando o aparelho de fermentação contínua da Fig. 2. A diferença de pressão transmembrana variou dentro de 2 kPa em todo o período de fermentação contínua.

EXEMPLO COMPARATIVO 16

PRODUÇÃO DE ÁCIDO D-LÁCTICO POR MEIO DE FERMENTAÇÃO EM BATELADAS

Como forma de fermentação utilizando microorganismo, a maior parte da fermentação de bateladas típica foi conduzida em fermentador de jarra de dois litros para avaliar a sua produtividade de ácido D-láctico. O meio foi utilizado após esterilização a vapor em alta pressão (121 °C, quinze minutos). Neste exemplo comparativo, linhagem NBRC10505/pTM63 foi utilizada como microorganismo, a concentração de ácido D-láctico como produto foi avaliada por meio de HPLC e a concentração de glicose foi medida com Teste de Glicose Wako C (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). As condições de

operação deste exemplo comparativo são as seguintes:

Capacidade do tanque de reação de fermentação (quantidade do meio de produção de ácido D-láctico): 1,0 (L)

Controle de temperatura: 30 (°C)

5 Aeração do tanque de reação de fermentação: 0,2 (l/min) ar

Velocidade de agitação do tanque de reação de fermentação: 300 (rpm)

Ajuste de pH: ajustado em pH 5,0 com 5 N NaOH

Em primeiro lugar, a linhagem de NBRC10505/pTM63 foi
 10 cultivada com agitação por uma noite em 5 ml de meio de produção de ácido D-láctico em tubo de ensaio (cultivo prévio preliminar). O cultivo resultante foi inoculado em 50 ml de meio de produção de ácido D-láctico novo e cultivado com agitação por 24 horas sob temperatura de 30 °C em frasco Sakaguchi de 500 ml (cultivo prévio). O cultivo prévio resultante foi inoculado em 1,5 l de
 15 meio de produção de ácido D-láctico em fermentador de jarra. O microorganismo foi submetido a fermentação em bateladas com o meio de produção de ácido D-láctico. Os resultados são exibidos na Tabela 26.

TABELA 26

	Exemplo Comparativo 16	Exemplo 31	Exemplo 32
Tempo de fermentação (h)	75	320	268
Glicose introduzida (g)	100	2790	2340
Ácido D-láctico produzido (g)	18.8	533	442
Glicose não utilizada (g)	0	55	50
Rendimento de ácido D-láctico (g/g)	18,8	19,5	19,3
Velocidade de produção de ácido D-láctico (g/l/h)	0,25	0,93	1,10

Pôde-se revelar que a velocidade de produção de ácido D-láctico foi significativamente aprimorada pelo método de fabricação de produto químico de acordo com a presente invenção utilizando o aparelho de fermentação exibido nas Figs. 1 e 2.

5

EXEMPLO DE REFERÊNCIA 13

PREPARAÇÃO DE MEMBRANA POROSA (Nº 5)

Homopolímero de fluoreto de vinilideno que possui peso molecular ponderal médio de 417.000 e γ -butirolactona foram fundidos sob temperatura de 170 °C em quantidades de 38% em peso e 62% em peso, respectivamente, para preparar solução padrão. Esta solução padrão, acompanhada por γ -butirolactona como líquido de formação de espaços ocos, foi descarregada de base e resfriada em banho de resfriamento que consiste de solução aquosa de γ -butirolactona a 80% sob temperatura de 20 °C para preparar membrana de fibra oca.

15

Em seguida, 14% em peso de homopolímero fluoreto de vinilideno que possui peso molecular ponderal médio de 284.000, 1% em peso de propionato acetato de celulose (CAP482-0.5 fabricado pela Eastman Chemical), 77% em peso de N-metil-2-pirrolidona, 5% em peso de ácido graxo de óleo de coco de polioxietileno sorbitan (nome comercial: Ionet T-20C, fabricado pela Sanyo Chemical Industries, Ltd.) e 3% em peso de água foram misturados e fundidos sob temperatura de 95 °C para preparar solução padrão. Esta solução padrão foi aplicada uniformemente sobre a superfície da membrana de fibra oca e imediatamente coagulada em banho de água para preparar membrana de fibra oca. A membrana de fibra oca resultante apresentou tamanho médio de poro de 0,05 μm sobre a superfície do lado tratado com água. Quando a membrana de separação foi avaliada para determinar o seu coeficiente de permeabilidade a água purificada, o coeficiente de permeabilidade a água purificada foi de $5,5 \times 10^{-9} \text{ m}^3/\text{m}^2 \cdot \text{s} \cdot \text{Pa}$. A medição do coeficiente de permeabilidade a água purificada

25

foi conduzida com água purificada tratada com membrana de osmose reversa a 25 °C com altura de cabeça de um metro. O desvio padrão do tamanho médio de poro foi de 0,006 μm .

EXEMPLO 33

PREPARAÇÃO DE ÁCIDO L-LÁCTICO COM MEMBRANA DE FIBRA OCA (Nº 1)

É descrito o elemento de membrana de separação exibido na Fig. 4 que possui área de filtragem efetiva de 120 cm^2 preparada utilizando membrana porosa preparada no Exemplo de Referência 13 como membrana de separação no mesmo teste de fermentação contínua de ácido L-láctico do Exemplo 1. Os resultados, junto com os resultados do Exemplo Comparativo 1, são exibidos na Tabela 27. A produção estável de ácido L-láctico por meio de fermentação contínua foi viável. A diferença de pressão transmembrana variou dentro de 2 kPa em todo o período de fermentação contínua.

EXEMPLO 34

PREPARAÇÃO DE ÁCIDO L-LÁCTICO COM MEMBRANA DE FIBRA OCA (Nº 2)

É descrito o elemento de membrana de separação exibido na Fig. 4 que possui área de filtragem efetiva de 120 cm^2 preparada utilizando membrana porosa preparada no Exemplo de Referência 13 como membrana de separação no mesmo teste de fermentação contínua de ácido L-láctico do Exemplo 4. Os resultados, junto com os resultados do Exemplo Comparativo 1, são exibidos na Tabela 27. Pôde-se confirmar que a produção estável de ácido L-láctico por meio de fermentação contínua foi viável. A diferença de pressão transmembrana variou dentro de 2 kPa em todo o período de fermentação contínua.

TABELA 27

	Exemplo Comparativo 1	Exemplo 33	Exemplo 34
Tempo de fermentação (h)	72	300	300
Glicose introduzida (g)	100	3210	2600

	Exemplo Comparativo 1	Exemplo 33	Exemplo 34
Ácido L-láctico total produzido (g)	26	1980	1570
Glicose não utilizada (g)	0	70	60
Rendimento de ácido L-láctico com relação a açúcar (g/g)	0,26	0,63	0,62
Velocidade de produção de ácido L-láctico (g/l/h)	0,36	3,3	3,5

APLICAÇÃO INDUSTRIAL

A presente invenção refere-se a método de fabricação de produto químico por meio de fermentação contínua, mantendo alta produtividade de forma estável por longo período por meio de método simples de operação.

- 5 Segundo a presente invenção, a fermentação contínua mantendo alta produtividade de forma estável por longo tempo sob condições simples de operação torna-se viável e produto químico que é produto de fermentação pode ser amplamente fabricado de forma estável sob baixo custo na indústria de fermentação.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Toray Industries, Inc
 <120> MÉTODO DE FABRICAÇÃO DE PRODUTO QUÍMICO E APARELHO DE
 FERMENTAÇÃO CONTÍNUA
 <130> 06082
 <160> 12
 <170> PatentIn version 3.1
 <210> 1
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> primer
 <400> 1
 ctcgagatgg caactctaaa ggatca 26
 <210> 2
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> primer
 <400> 2
 gcggccgctt aaaattgcag ctcctttt 28
 <210> 3
 <211> 999
 <212> DNA
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 3
 atggcaactc taaaggatca gctgatttat aatctttctaa aggaagaaca gacccccag 60
 aataagatta cagttgttgg ggttggtgct gttggcatgg cctgtgccat cagtatctta 120
 atgaaggact tggcagatga acttgctctt gttgatgtca tcgaagacaa attgaaggga 180
 gagatgatgg atctccaaca tggcagcctt ttccttagaa caccaaagat tgtctctggc 240
 aaagactata atgtaactgc aaactccaag ctggtcatta tcacggctgg ggcacgtcag 300
 caagagggag aaagccgtct taatttggtc cagcgtaacg tgaacatatt taaattcatc 360

attcctaatag ttgtaaaata cagcccgaac tgcaagttgc ttattgtttc aaatccagtg 420
 gatatacttga cctacgtggc ttggaagata agtggttttc ccaaaaaccg tgttattgga 480
 agtgggttgca atctggattc agcccgattc cgttacctga tgggggaaag gctgggagtt 540
 caccattaa gctgtcatgg gtgggtcctt ggggaacatg gagattccag tgtgcctgta 600
 tggagtggaa tgaatgttgc tgggtgtctct ctgaagactc tgcaccaga tttagggact 660
 gataaagata aggaacagtg gaaagagggt cacaagcagg tggttgagag tgcttatgag 720
 gtgatcaaac tcaaaggcta cacatcctgg gctattggac tctctgtagc agatttggca 780
 gagagtataa tgaagaatct taggcgggtg caccagttt ccaccatgat taagggtctt 840
 tacggaataa aggatgatgt cttccttagt gttccttgca ttttgggaca gaatggaatc 900
 tcagaccttg tgaaggtgac tctgacttct gaggaagagg cccgtttgaa gaagagtgca 960
 gatacacttt gggggatcca aaaggagctg caattttaa 999

<210> 4
 <211> 80
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> primer

<400> 4
 tctcaattat tattttctac tcataacctc acgcaaaata acacagtcaa atcaatcaaa 60
 atggcaactc taaaggatca 80

<210> 5
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> primer

<400> 5
 aggcgatatca cgaggccctt 20

<210> 6
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 6
gaattaattc ttgaagacga aagggcctcg tgatacgcct agattgtact gagagtgcac 60

<210> 7
<211> 80
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer

<400> 7
tatttttcgt tacataaaaa tgcttataaa actttaacta ataattagag attaaatcgc 60

ctgtgcggta tttcacaccg 80

<210> 8
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer

<400> 8
caaatatcgt ttgaatatTT ttccg 25

<210> 9
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer

<400> 9
aatccagatt gcaaccactt 20

<210> 10
<211> 1011
<212> DNA
<213> *Bacillus laevolacticus*

<400> 10

atgaaattct tgatgtatgg agtacaagat catgagagag caacgatcga gaattgggca 60
aatcaacatc aggtggagat cgcaacaacc tcagatttcc tctcagaaga tacagtcgct 120
caatcgaaag gctttgacgg tatctgcatt caacagccga ttgcactcgg aggcccgaaat 180

```

ttatacactc aattaataaaa caacggtatc aaacagattg ctacacgaac agccgggttac 240
gacatgattg atttgaacga agccgagaaa aacagtttgt tggtagacaa tgttccagca 300
tactcccctt acgcagtcgc cgagctcgcg gtcactcagg cgatgcagct cgtccgccat 360
attcctgaat tcaataaacg tgttgcaggc aaagattttc gctggtcagg ccttatttcc 420
agagaaatcc gatcattaac ggtcggcata gtcggcaccg gccgcatcgg tgcaacggcc 480
gcacagctct tcaaaggact aggggcaaaa atcattgggt ttgatcaata tcccaacgat 540
cggctaaacg gtatccttga ctatcggcct tcacttgaag acgtgcttaa ggaagctgat 600
atcattttct ttcacacgcc gctttttgat tcgactcggc acatgatcaa taaaagcaca 660
ttaaactga tgaaaaatag tgcctatcta atcaatgttg ccagaggcgg ctttaataaa 720
actgaagatc tgattgaagc acttgaaaac ggcgaaattg ccggtgcagc gttagatacc 780
tttgaaaatg aactcatgat taataaagat ctgagtaagc agccgctcaa tgatccgctt 840
ctttcgaaac ttctcgatat ggaacaagtg ctgctcacac cgcatgtcgg cttctttact 900
gagaccgcca ttcaaaacat tgttgaaggt gccttagaca gtgttgtcga ggttttgaag 960
acaggaacaa gcaaaaatct tgttcaagca caaccgctat cggcaaaata a 1011

```

```

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

```

```

<220>
<223> primer

```

```

<400> 11
ctcgagatga aattcttgat gtatggagta 30

```

```

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

```

```

<220>
<223> primer

```

```

<400> 12
gcggccgctt attttgccga tagcggttgt 30

```

REIVINDICAÇÕES

1. MÉTODO DE FABRICAÇÃO DE PRODUTO QUÍMICO, por meio de fermentação contínua que inclui a filtração de cultivo de microorganismo ou células cultivadas com membrana de separação para recuperar produto de filtrado, retenção simultânea de fluido não filtrado no cultivo ou envio para ele em refluxo e adição de materiais de fermentação ao cultivo, em que membrana porosa que possui tamanho médio de poro de 0,01 μm ou mais a menos de 1 μm é utilizada como membrana de separação e a filtração é conduzida com diferença de pressão transmembrana na faixa de 0,1 a 20 kPa.
2. MÉTODO DE FABRICAÇÃO DE PRODUTO QUÍMICO, de acordo com a reivindicação 1, em que o coeficiente de permeabilidade a área purificada para a membrana porosa é de preferencialmente $2 \times 10^{-9} \text{ m}^3/\text{m}^2/\text{s}/\text{pa}$ ou mais a $6 \times 10^{-7} \text{ m}^3/\text{m}^2/\text{s}/\text{pa}$ ou menos.
3. MÉTODO DE FABRICAÇÃO DE PRODUTO QUÍMICO, de acordo com a reivindicação 1, em que o tamanho médio de poro da membrana porosa é de 0,1 μm ou mais a menos de 0,2 μm e o desvio padrão do tamanho de poro da membrana porosa é de 0,1 μm ou menos.
4. MÉTODO DE FABRICAÇÃO DE PRODUTO QUÍMICO, de acordo com a reivindicação 1, em que a membrana porosa é preferencialmente membrana porosa que possui aspereza de superfície de 0,1 μm ou menos.
5. MÉTODO DE FABRICAÇÃO DE PRODUTO QUÍMICO, de acordo com a reivindicação 1, em que a membrana porosa é preferencialmente membrana porosa que contém camada de resina porosa.
6. MÉTODO DE FABRICAÇÃO DE PRODUTO QUÍMICO, de acordo com a reivindicação 5, em que a camada de resina porosa é camada de resina porosa fabricada com polímero orgânico.
7. MÉTODO DE FABRICAÇÃO DE PRODUTO QUÍMICO, de

acordo com a reivindicação 5, em que o material da membrana de polímero orgânico é fluoreto de polivinilideno.

8. MÉTODO DE FABRICAÇÃO DE PRODUTO QUÍMICO, de acordo com a reivindicação 1, em que o cultivo do microorganismo ou células cultivadas e os materiais de fermentação contêm açúcares.

9. MÉTODO DE FABRICAÇÃO DE PRODUTO QUÍMICO, de acordo com a reivindicação 1, em que o produto químico é ácido orgânico.

10. MÉTODO DE FABRICAÇÃO DE PRODUTO QUÍMICO, de acordo com a reivindicação 1, em que o produto químico é ácido L-láctico.

11. MÉTODO DE FABRICAÇÃO DE PRODUTO QUÍMICO, de acordo com a reivindicação 1, em que o produto químico é ácido D-láctico.

12. MÉTODO DE FABRICAÇÃO DE PRODUTO QUÍMICO, de acordo com a reivindicação 1, em que o produto químico é ácido pirúvico.

13. MÉTODO DE FABRICAÇÃO DE PRODUTO QUÍMICO, de acordo com a reivindicação 1, em que o produto químico é ácido succínico.

14. MÉTODO DE FABRICAÇÃO DE PRODUTO QUÍMICO, de acordo com a reivindicação 1, em que o produto químico é ácido itacônico.

15. MÉTODO DE FABRICAÇÃO DE PRODUTO QUÍMICO, de acordo com a reivindicação 1, em que o produto químico é cadaverina.

16. MÉTODO DE FABRICAÇÃO DE PRODUTO QUÍMICO, de acordo com a reivindicação 1, em que o produto químico é álcool.

17. MÉTODO DE FABRICAÇÃO DE PRODUTO QUÍMICO, de acordo com a reivindicação 1, em que o produto químico é etanol.

18. MÉTODO DE FABRICAÇÃO DE PRODUTO QUÍMICO, de acordo com a reivindicação 1, em que o produto químico é 1,3-propanodiol.

19. MÉTODO DE FABRICAÇÃO DE PRODUTO QUÍMICO, de acordo com a reivindicação 1, em que o produto químico é ácido nucleico.

20. MÉTODO DE FABRICAÇÃO DE PRODUTO QUÍMICO, de

acordo com a reivindicação 1, em que o produto químico é inosina.

21. MÉTODO DE FABRICAÇÃO DE PRODUTO QUÍMICO, de acordo com a reivindicação 1, em que o produto químico é aminoácido.

22. MÉTODO DE FABRICAÇÃO DE PRODUTO QUÍMICO, de acordo com a reivindicação 1, em que o produto químico é L-treonina.

23. APARELHO DE FERMENTAÇÃO CONTÍNUA, que é aparelho de fabricação de produto químico por meio de fermentação contínua, que inclui a filtragem de cultivo de microorganismo ou células cultivadas com membrana de separação para recuperar produto de filtrado, retenção simultânea de fluido não filtrado no cultivo de fermentação ou envio para ele em refluxo e adição de materiais de fermentação ao cultivo de fermentação, que compreende:

- tanque de reação de fermentação para cultivo de fermentação de microorganismo ou células cultivadas; tanque de separação de membrana para filtragem do cultivo de fermentação, que é conectado por meios de circulação de cultivo de fermentação ao tanque de reação de fermentação e nele equipado com membrana de separação; e meios de regulação da diferença de pressão transmembrana da membrana de separação na faixa de 0,1 a 20 kPa;

em que a membrana de separação é membrana porosa que possui tamanho médio de poro de 0,01 μm ou mais a menos de 1 μm .

24. APARELHO DE FERMENTAÇÃO CONTÍNUA, que é aparelho de fabricação de produto químico por meio de fermentação contínua, que inclui a filtragem de cultivo de fermentação de microorganismo ou células cultivadas com membrana de separação para recuperar produto de filtrado, retenção simultânea de fluido não filtrado no cultivo ou envio para ele em refluxo e adição de materiais de fermentação ao cultivo de fermentação, que compreende:

- tanque de reação de fermentação para fermentação de microorganismo ou células cultivadas; elemento de membrana de separação para filtragem do cultivo de fermentação, que é disposto no interior do tanque de reação de fermentação e equipado no seu interior com membrana de separação; meios de descarga de produto de fermentação filtrado, que são conectados ao elemento de membrana de separação; e meios de regulação da diferença de pressão transmembrana da membrana de separação na faixa de 0,1 a 20 kPa;

em que a membrana de separação é membrana porosa que possui tamanho médio de poro de 0,01 μm ou mais a menos de 1 μm .

25. APARELHO DE FERMENTAÇÃO CONTÍNUA, de acordo com qualquer das reivindicações 23 ou 24, em que o coeficiente de permeabilidade a água purificada da membrana porosa é de $2 \times 10^{-9} \text{ m}^3/\text{m}^2/\text{s}/\text{pa}$ ou mais a $6 \times 10^{-7} \text{ m}^3/\text{m}^2/\text{s}/\text{pa}$ ou menos.

26. APARELHO DE FERMENTAÇÃO CONTÍNUA, de acordo com qualquer das reivindicações 23 ou 24, em que o tamanho médio de poro da membrana porosa é de 0,01 μm ou mais a menos de 0,2 μm e o desvio padrão do tamanho de poro da membrana porosa é de 0,1 μm ou menos.

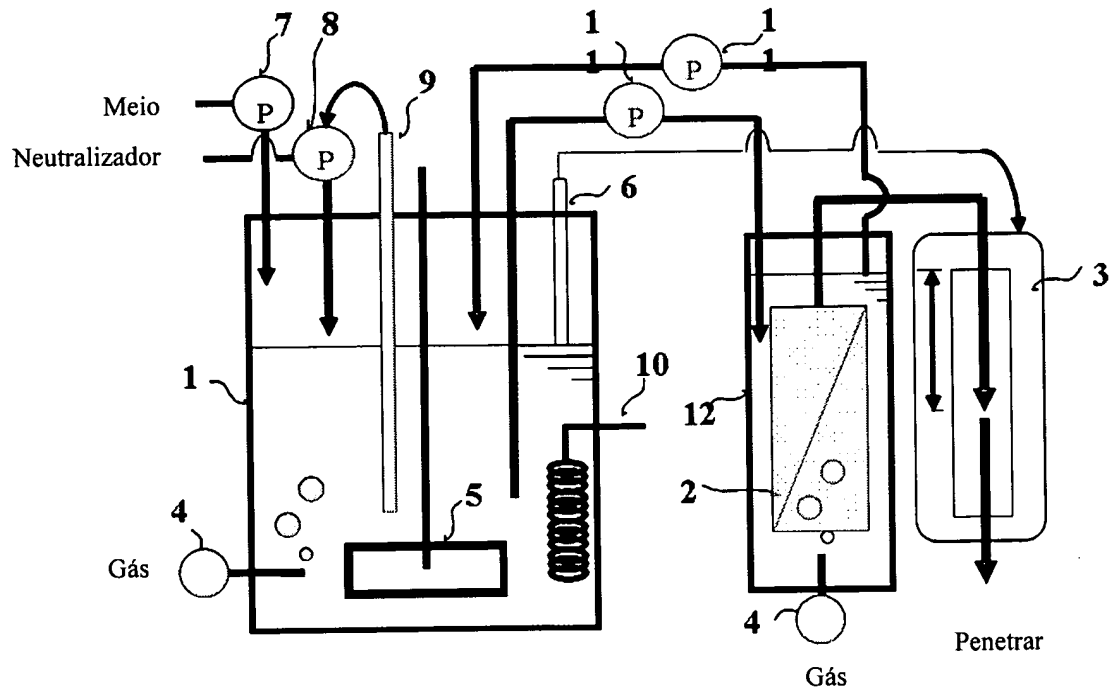


Fig. 1

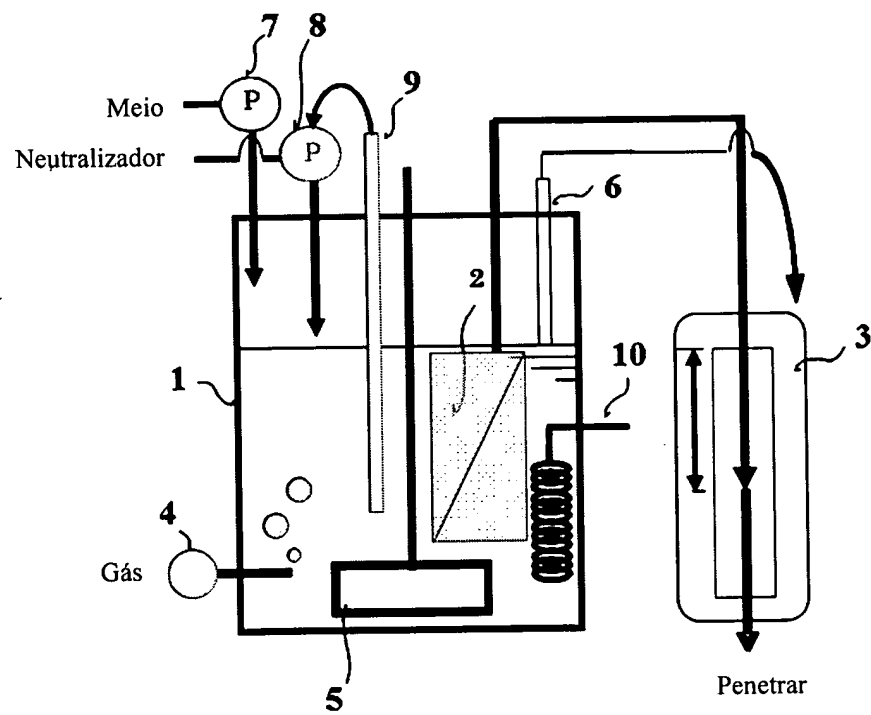


Fig. 2

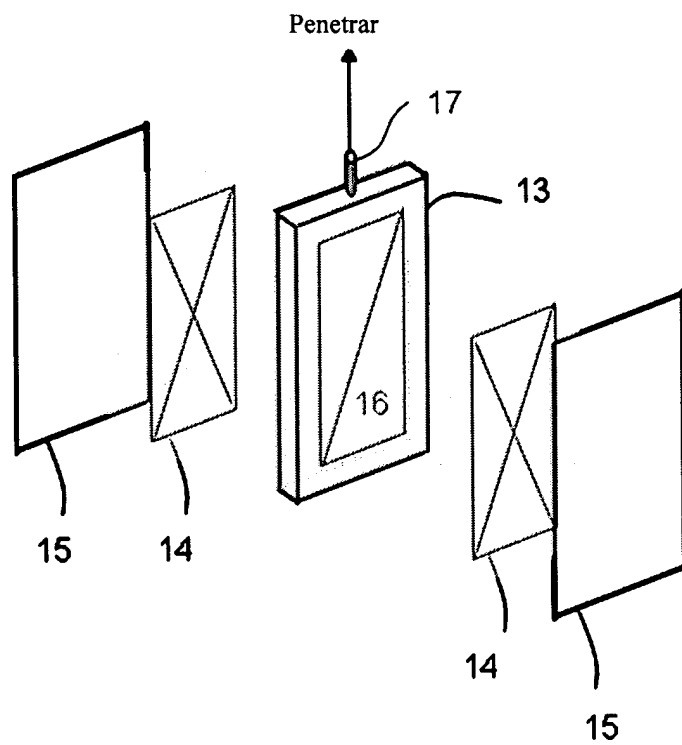


Fig. 3

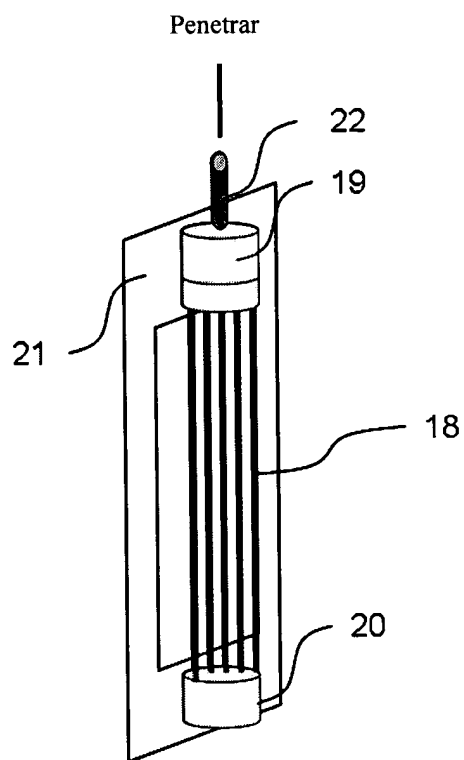
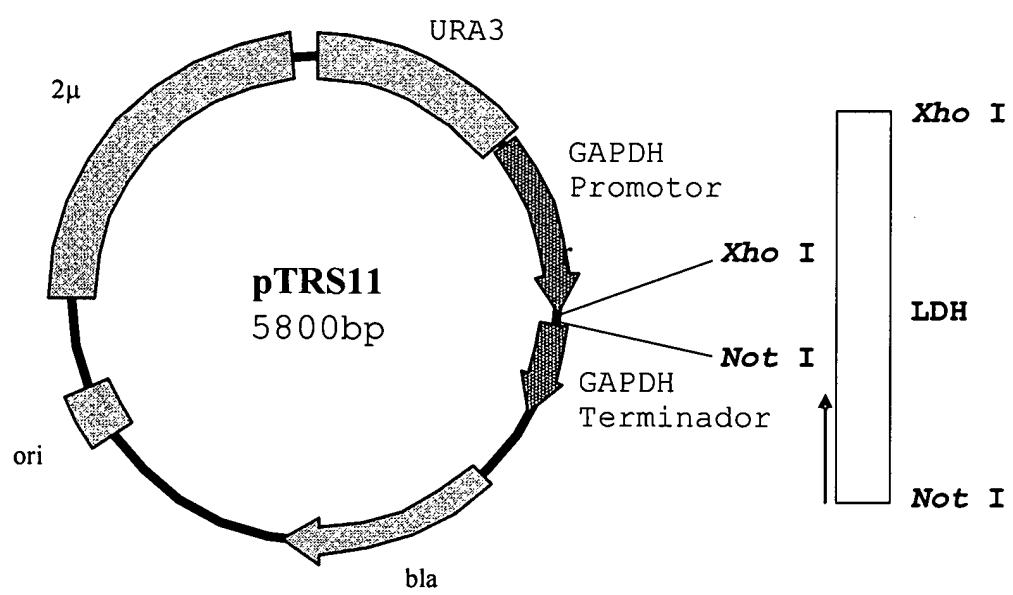


Fig. 4

**Fig. 5**

RESUMO**“MÉTODO DE FABRICAÇÃO DE PRODUTO QUÍMICO E APARELHOS DE
FERMENTAÇÃO CONTÍNUA”**

A presente invenção fornece método de fabricação de produto químico por meio de fermentação contínua, que inclui a filtração de cultivo de microorganismo ou células cultivadas com membrana de separação para recuperar produto de filtrado, retenção simultânea de fluido não filtrado no cultivo ou envio para ele em refluxo e adição de materiais de fermentação ao cultivo, em que membrana porosa que possui tamanho médio de poro de 0,01 μm ou mais a menos de 1 μm é utilizada como membrana de separação e a filtração é conduzida com diferença de pressão transmembrana na faixa de 0,1 a 20 kPa. Segundo este método, a produtividade de fermentação do produto químico pode ser grandemente elevada sob alta estabilidade e baixo custo.