República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria, Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0815409-0 B1

(22) Data do Depósito: 14/08/2008

(45) Data de Concessão: 24/01/2023

(54) Título: PROCESSOS PARA A PRODUÇÃO FERMENTATIVA DE UM COMPOSTO, E PARA A PRODUÇÃO DE UM COMPOSTO, E, USO DE UMA CEPA BACTERIANA

(51) Int.Cl.: C12N 1/20; C12P 7/46; C12P 17/10.

(30) Prioridade Unionista: 17/08/2007 EP 07114574.2.

(73) Titular(es): BASF SE.

(72) Inventor(es): EDZARD SCHOLTEN; DIRK DÄGELE; STEFAN HAEFNER; HARTWIG SCHRÖDER.

(86) Pedido PCT: PCT EP2008006714 de 14/08/2008

(87) Publicação PCT: WO 2009/024294 de 26/02/2009

(85) Data do Início da Fase Nacional: 12/02/2010

(57) Resumo: CEPA BACTERIANA, PROCESSOS PARA A PRODUÇÃO FERMENTATIVA DE UM COMPOSTO, E PARA A PRODUÇÃO DE UM COMPOSTO, E, USO DE UMA CEPA BACTERIANA. A presente invenção diz respeito a uma nova cepa bacteriana designada DD1, que tem a capacidade de produzir ácidos orgânicos, em particular ácido succínico (SA), o qual tenha sido originalmente isolado do rúmen bovino, e seja capaz de utilizar glicerol como uma fonte de carbono; e cepas variantes dele derivadas retendo referida capacidade; bem como a métodos de produzir ácidos orgânicos, em particular o ácido succínico, mediante o uso do referido microorganismo.

"PROCESSOS PARA A PRODUÇÃO FERMENTATIVA DE UM COMPOSTO, E PARA A PRODUÇÃO DE UM COMPOSTO, E, USO DE UMA CEPA BACTERIANA"

A presente invenção diz respeito a uma nova cepa bacteriana designada DD1, que tem a capacidade de produzir ácidos orgânicos em particular ácido succínico (SA), o qual tenha sido originalmente isolado do rúmen bovino, e seja capaz de utilizar glicerol como uma fonte de carbono; e cepas variantes dele derivadas retendo a referida capacidade; assim como a métodos de produzir ácidos orgânicos, em particular o ácido succínico, fazendo uso do referido microorganismo.

Fundamentos Da Técnica

A produção fermentativa do ácido succínico (SA) da biomassa já tem chamado muita atenção, tendo em vista que o referido ácido representa um importante constituinte das resinas sintéticas ou é uma fonte de outros compostos químicos valiosos de baixo peso molecular, em particular o tetraidrofurano (THF), 1,4-butanodiol (BDO), gama-butirolactona (GBL) e pirrolidonas (WO-A 2006/066830).

Uma bactéria geradora de SA isolada do rúmen bovino foi descrita por Lee *et al*. (2002a). A bactéria é um bastão ou cocobacilo Gram-negativos não móveis, não formadores de esporos, mesofílicos e capnofílicos. A análise filogenética com base na sequência de rRNA 16S e a análise fisiológica indicaram que a cepa pertence ao gênero Mannheimia como uma nova espécie, e foi denominada Mannheimia succiniciproducens MBEL55E. Sob condições de 100 % de CO_2, ela cresce bem na faixa de pH de 6,0 a 7,5 e produz ácido succínico, ácido acético e ácido fórmico em uma relação constante de 2:1:1. Quando a M. succiniciproducens MBEL55E foi cultivada anaerobicamente sob saturação de CO_2 com glicose como fonte de carbono, 19,8 g/litro de glicose foram consumidas e 13,3 g/litro de SA foram produzidos em 7,5 horas de incubação.

Um inconveniente significativo do referido organismo é, no entanto, sua incapacidade para metabolizar glicerol, o qual, como um constituinte dos gliceróis triacílicos (TAGs), se torna facilmente disponível, por exemplo, como subproduto na reação de transesterificação da produção de Biodiesel (Dharmadi *et al.*, 2006).

A produção fermentativa do ácido succínico do glicerol foi descrita na literatura científica (Lee *et al.*, 2001; Dharmadi *et al.*, 2006) e com produções de glicerol mais elevadas (massa de SA produzida/massa de material bruto consumida) do que com os açúcares comuns como a glicose foram obtidas (Lee *et al.*, 2001). Entretanto, a produção de espaço-tempo obtida com o glicerol foi substancialmente inferior do que com a glicose (0,14 vs 1,0 g de SA/[L h]) e nenhum glicerol bruto foi usado.

Apenas em uns poucos casos a metabolização anaeróbica do glicerol a produtos de fermentação foi descrita. *E. coli* é capaz de fermentar glicerol sob condições muito específicas, tais como o pH acídico, evitando-se o acúmulo do hidrogênio gasoso da fermentação, e a composição média apropriada (Dharmadi *et al.* 2006. Yazdani e Gonzalez 2007). Muitos microorganismos são capazes de metabolizar glicerol na presença de aceptores de elétrons externos (metabolismo respiratório), uns poucos são capazes de fazê-lo fermentativamente (isto é, na ausência de aceptores de elétrons). O metabolismo fermentativo do glicerol foi estudado em grandes detalhes em várias espécies da família das *Enterobacteriaceae*, tais como as *Citrobacter freundii* e *Klebsiella pneumoniae*. A desassimilação do glicerol nestes organismos é estritamente ligada à sua capacidade de sintetizar o produto altamente reduzido 1,3-propanodiol (1,3-PDO) (Dharmadi *et al.* 2006). A conversão do glicerol em ácido succínico com o uso da *Anaerobiospirillum succiniciproducens* foi relatada (Lee *et al.* 2001). Este estudo demonstrou que o ácido succínico pode ser produzido com pouca formação do subproduto ácido acético mediante o uso de glicerol como uma

fonte de carbono, assim facilitando a purificação do ácido succínico. A produção mais elevada foi obtida pela alimentação intermitente do glicerol e do extrato de levedura, uma estratégia que resultou na produção de cerca de 19 g/litro de ácido succínico. Foi observado, entretanto, que os componentes nutricionais não identificados presentes no extrato de levedura foram necessários para que a fermentação do glicerol pudesse ocorrer.

As reações de carboxilação do oxaloacetato catalisado pelas enzimas fosfoenopiruvato carboxilase (PEPCK) e piruvato carboxilase (PycA) são feitas utilizando-se HCO_3^- como uma fonte de CO_2 (Peters-Wendisch, P. G. *et al.*). Portanto, as fontes de hidrogencarbonato, tais como $NaHCO_3$, $KHCO_3$, NH_4HCO_3 e assim por diante, podem ser aplicadas aos meios de fermentação e de cultivo para melhorar a disponibilidade do HCO_3^- nas metabolizações dos substratos ao ácido succínico. A produção do ácido succínico a partir da glicose não foi observada como sendo dependente da adição de HCO_3^- na técnica anterior, até agora.

A produção da biomassa pelos organismos anaeróbicos é limitada pela quantidade de ATP produzida das vias fermentativas. A produção da biomassa do glicerol em organismos anaeróbicos é meia baixa do que dos sacarídeos, como as hexoses tais como a glicose, a frutose, as pentoses tais como a xilose, arabinose ou dissacarídeos tais como a sacarose ou a maltose (Lee *et al.* 2001, Dharmadi 2007).

Os sacarídeos, entretanto, teoricamente podem ser convertidos em ácido succínico com uma produção significativamente menor do que o glicerol, por causa do estado de redução mais baixo dos sacarídeos em comparação com o poliol glicerol. A combinação dos sacarídeos com glicerol foi observada funcionar em organismos anaeróbicos geradores de um ácido succínico (Lee *et al.* 2001), porém sem alcançar títulos de ácido succínico além de 28 g/litro.

Existe, portanto, uma necessidade de outras cepas bacterianas,

que tenham a capacidade de produzir ácidos orgânicos, em particular SA, do glicerol. Em particular, tais cepas devem produzir referidos ácidos com alta produtividade a partir do glicerol, especialmente se glicerol bruto, por exemplo da produção de biodiesel podendo ser usado sem purificação prévia.

Sumário Da Invenção

É um objeto da presente invenção prover uma cepa bacteriana tendo a capacidade de produzir ácido succínico do glicerol, especialmente do glicerol bruto.

Referido objeto foi solucionado pelos presentes inventores, os quais surpreendentemente isolaram uma nova cepa bacteriana, designada DD1, tendo a característica metabólica desejada.

Breve Descrição Das Figuras

A Figura 1 mostra a árvore filogenética para DD1.

A Figura 2 mostra a sequência de rDNA 16S (SEQ ID NO: 1) de DD1.

A Figura 3 mostra a sequência de rDNA 23S (SEQ ID NO: 2) de DD1, seu alinhamento às correspondentes seis sequências individuais de "*M. succiniciproducens*" MBEL55E, em que as diferenças entre a sequência DD1 (fundo) e as sequências MBEL55E são realçadas e são apresentadas no Anexo 1 separado.

A Figura 4 mostra uma gravura microscópica óptica de DD1.

A Figura 5 mostra culturas de bateladas controladas por NH_4OH do DD1 em diferentes concentrações iniciais da glicose.

A Figura 6 mostra os culturas de bateladas controladas por NH_4OH do DD1 em diferentes temperaturas e valores de pH.

A Figura 7 mostra os culturas de bateladas controladas por NH_4OH do DD1. As figuras representam níveis iniciais [g/litro) de extrato de levedura (Y), peptona (P) e licor de impregnação de milho (C).

A Figura 8 mostra subprodutos obtidos nos cultivos de

bateladas controlados por NH_4OH de DD1 com e sem peptona.

A Figura 9 mostra os resultados das culturas de bateladas aeróbicas de DD1 com glicose como fonte de C.

A Figura 10 mostra os resultados de uma cultura de bateladas anaeróbica de DD1 sob condições de saturação de CO_2 com glicose, como descrito por Lee *et al*, 2002a e 2002b.

Descrição Detalhada Da Invenção

Uma primeira forma de realização da invenção diz respeito a uma cepa bacteriana, designada DD1, a qual pode ser isolada do rúmen bovino, e é capaz de utilizar glicerol (incluindo o glicerol bruto) como uma fonte de carbono; e cepas variantes dela derivadas retendo-se referida capacidade.

Preferivelmente, referida cepa tem a capacidade de produzir ácido succínico do glicerol (incluindo o glicerol bruto), em particular sob condições anaeróbicas.

Em particular, a nova cepa tem um rDNA 18S de SEQ ID NO: 1 ou uma sequência que apresente homologia de sequência de pelo menos 96, 97, 98, 99 ou 99,9 % e/ou um rDNA 23S de SEQ ID NO: 2, ou uma sequência que apresente uma homologia de sequência de pelo menos 95, 96, 97, 98, 99 ou 99,9 %.

"Identidade" ou "homologia" entre duas sequências de nucleotídeos significa identidade dos resíduos através do comprimento completo das sequências alinhadas, tais como, por exemplo, a identidade calculada (para propriamente sequências semelhantes) com o auxílio do programa *needle* do pacote de software da bioinformática *EMBOSS* (Versão 5.0.0, http://emboss.sourceforge.net/what/) com os parâmetros básicos que são:

-gapopen (penalidade para abrir uma descontinuidade): 10.0

-gapextend (penalidade para estender uma descontinuidade):

0,5

-datafile (artigo matriz de classificação incluído no pacote): EDNAFUL

Um alinhamento da sequência de rDNA 23S da Cepa DD1 para as correspondentes seis sequências individuais de "*M. succiniciproducens*" MBEL55E é mostrado no Anexo 1. Nele, as diferenças entre a sequência de DD1 (fundo) e as seis sequências de rDNA 23S das sequências MBEL55E são realçadas. A sequência DD1 (ver também a SEQ ID NO: 2) representa a informação de sequência obtida pela sequenciação do rDNA 23S do DD1 amplificado por PCR. As experiências de sequenciação resultaram em uma informação se sequência não ambígua, indicando que a informação de rDNA 23S derivável de DD1 pode ser usada como aspecto distintivo da cepa DD1. Referida sequência de DD1 difere em pelo menos 6 posições de sequência de cada sequência MBEL55E individual. A diferença mais significativa é um inserto de cerca de 133 pares de base dentro de cada das sequências MBLE55E (próximas à posição 1325), o qual está faltando na sequência DD1. Outras diferenças específicas significativas acham-se nas posições 451, 1741, 2040, 2041, 2045 e 2492 (como a numeração usada no alinhamento).

A cepa da presente invenção também preferivelmente apresenta pelo menos uma das seguintes características metabólicas adicionais:

a) produção do ácido succínico da sacarose; em particular sob condições anaeróbicas;

b) produção do ácido succínico da maltose; em particular sob condições anaeróbicas;

c) produção do ácido succínico da D-frutose; em particular sob condições anaeróbicas;

d) produção do ácido succínico da D-galactose; em particular

sob condições anaeróbicas;

e) produção do ácido succínico da D-manose; em particular sob condições anaeróbicas;

f) produção do ácido succínico da D-glicose; em particular sob condições anaeróbicas;

g) produção do ácido succínico da D-xilose; em particular sob condições anaeróbicas;

h) produção do ácido succínico da L-arabinose; em particular sob condições anaeróbicas;

i) nenhuma utilização do xilitol, do inositol e do sorbitol;

j) crescimento sob condições tanto aeróbicas quanto anaeróbicas;

k) crescimento nas concentrações iniciais da glicose de 75 g/litro ou mais;

l) tolerância à amônia.

Em particular, a referida cepa apresenta pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ou todos os aspectos adicionais.

DD1 foi, por exemplo, ainda analisado quanto à capacidade para co-metabolizar maltose e glicerol resultando na formação da biomassa, na formação do ácido succínico e na utilização simultânea da maltose e do glicerol.

O termo "ácido" (no contexto dos ácidos mono- ou dicarboxílicos orgânicos, como aqui referidos, por exemplo os ácidos acéticos, lácticos e succínicos) tem de ser entendido em seu sentido mais amplo e também inclui os sais destes, como, por exemplo, os sais de metais alcalinos, como os sais de Na e de K, ou os sais de metais alcalino-terrosos, como os sais de Mg e de Ca, ou os sais de amônio; ou anidridos dos referidos ácidos.

A expressão "glicerol bruto" tem de ser entendida como

corrente contendo glicerol não tratado" quando ela provém nos processos em que o glicerol é um subproduto, como, por exemplo, a produção do diesel ou do bioetanol. A menos que de outra forma estabelecido, o termo "glicerol", como aqui usado, também inclui "glicerol bruto".

Em uma forma de realização preferida, a invenção diz respeito a uma cepa bacteriana (DD1 quando depositada com a DSMZ, e tendo o número de depósito DSM 18541, e cepas variantes e mutantes desta derivadas. Referidas variantes e mutantes conservam pelo menos referida capacidade de produzir ácido succínico (SA) do glicerol, da sacarose, da maltose, da D-glicose, da D-frutose e/ou da D-xilose. Em particular, elas podem também ter um rDNA 16S da SEQ ID NO: 1 ou uma sequência que apresente uma homologia de sequência de pelo menos 96, 97, 98, 99 ou 99,9 % e/ou rDNA 23S da SEQ ID NO: 2 ou sequência que apresente uma homologia de sequência de pelo menos 95, 96, 97, 98, 99 ou 99,9 %. As variantes ou mutantes da referida cepa DD1 podem ter um rDNA 23S diferente daquele da SEQ ID NO: 2, ao mesmo tempo em que mantém pelo menos uma das diferenças de sequências como examina acima, que discrimine a sequência de rDNA 23S daquela da cepa MBEL, 55E. Como, por exemplo, o inserto de 132 pares de base está faltando em tais variantes ou mutantes também, opcionalmente combinados com um ou mais das outras diferenças específicas das sequências apresentadas no alinhamento do Anexo 1.

De acordo com outra forma de realização, a cepa bacteriana da invenção se acha convertendo pelo menos uma fonte de carbono selecionada de sacarose, maltose, D-frutose, D-glicose, D-xilose, L-arabinose, D-galactose, D-manose e/ou glicerol ou ácido succínico com um coeficiente de rendimento YP/S de pelo menos 0,5 g/g até cerca de 1,28 g/g; como, por exemplo, um coeficiente de rendimento YP/S de pelo menos 0,6 g/g de pelo menos 0,7 g/g, de pelo menos 0,75 g/g, de pelo menos 0,8 g/g, de pelo menos

0,85 g/g, de pelo menos 0,9 g/g, de pelo menos 0,95 g/g, de pelo menos 1,0 g/g, de pelo menos 1,05 g/g, de pelo menos 1,1 g/g, de pelo menos 1,15 g/g, de pelo menos 1,20 g/g, de pelo menos 1,22 g/g, ou de pelo menos 1,24 g/g.

De acordo com ainda outra forma de realização, a cepa bacteriana da invenção se converte em pelo menos 28 g/litro de glicerol a pelo menos 28,1 g/litro de ácido succínico, com um coeficiente de produção YP/S de pelo menos 1,0 g/g, ou de >1,0 g/g, ou de >1,05 g/g, ou de >1,1 g/g, ou de >1,15 g/g,ou de >1,20 g/g, ou de >1,22 g/g, ou de >1,24 g/g, até cerca de 1,28 g/g. Por exemplo, 28 g/litro de glicerol podem ser convertido a até cerca de 40, ou até cerca de 35 g/litro de ácido succínico.

De acordo com ainda outra forma de realização, a cepa bacteriana da invenção converte pelo menos uma fonte de carbono selecionada de sacarose, maltose, D-frutose, D-glicose, D-xilose, L-arabinose, D-galactose, D-manose e/ou glicerol, em ácido succínico, com um rendimento de produtividade específica de pelo menos 0,6 g $gDCW^{-1}$ h^{-1} de ácido succínico, ou de pelo menos 0,65, de pelo menos 0,7 g $gDCW^{-1}$ h^{-1}, de pelo menos 0,75 g $gDCW^{-1}$ h^{-1},, ou de pelo menos 0,77 g $gDCW^{-1}$ h^{-1} de ácido succínico.

Em conformidade ainda com outra forma de realização, a cepa bacteriana da invenção converte pelo menos uma fonte de carbono selecionada de sacarose, maltose, D-frutose, D-glicose, D-xilose, L-arabinose, D-galactose, D-manose e/ou glicerol, em ácido succínico, com um rendimento de tempo-espaço quanto ao ácido succínico de pelo menos 2,2 g/(l h) ou de pelo menos 2,5, pelo menos 2,75, pelo menos 3, pelo menos 3,25, pelo menos 3,5 ou pelo menos 3,7 g/(l h) de ácido succínico.

De acordo ainda com outra forma de realização, a cepa bacteriana da invenção converte pelo menos 28 g/litro de pelo menos uma fonte de carbono selecionada de sacarose, maltose, D-frutose, D-glicose, D-xilose, L-arabinose, D-galactose, D-manose e/ou glicerol, em ácido succínico,

com um rendimento de tempo-espaço quanto ao ácido succínico de pelo menos 2,2 g/(l h) ou de pelo menos 2,5, pelo menos 2,75, pelo menos 3, pelo menos 3,25, pelo menos 3,5 ou pelo menos 3,7 g/(l h).

De acordo ainda com outra forma de realização, a cepa bacteriana da invenção converte pelo menos uma fonte de carbono selecionada de sacarose, maltose, D-frutose, D-glicose, D-xilose, L-arabinose, D-galactose, D-manose e/ou glicerol, em ácido succínico, com um rendimento de produtividade específica de pelo menos 0,6 g $gDCW^{-1}$ h^{-1} ou de pelo menos 0,65 ou de pelo menos 0,7 g $gDCW^{-1}$ h^{-1} de ácido succínico, ou de pelo menos 0,77 g $gDCW^{-1}$ h^{-1} de ácido succínico, e um rendimento de tempo-espaço quanto ao ácido succínico de pelo menos 2,2 g/(l h), ou de pelo menos 2,5, pelo menos 2,75, pelo menos 3, pelo menos 3,25, pelo menos 3,5 ou pelo menos 3,7 g/(l h).

Em outra forma de realização das cepas bacterianas reivindicadas, como definidas acima, a fonte de carbono é o glicerol ou uma mistura de glicerol e pelo menos uma outra fonte de carbono selecionada dentre sacarose, maltose, D-frutose, D-galactose, D-manose, D-glicose, D-xilose e L-arabinose.

Os diferentes parâmetros de rendimento como aqui descritos ["rendimento" ou YP/S; "Rendimento de Produtividade Específica"; ou Rendimento de Tempo-Espaço (STY)] são bem conhecidos na técnica e são determinados como descrito, por exemplo, por Song e Lee, 2006.

"Rendimento" e "YP/S" (cada um expresso em massa do produto produzido/massa do material consumido) são aqui usados como sinônimos.

O rendimento de produtividade específica descreve a quantidade de um produto, como o ácido succínico, que é produzido por h e l de caldo de fermentação por grama da biomassa seca. A quantidade de peso de células secas estabelecida como DCW, descreve a quantidade de

microorganismo biologicamente ativo em uma reação bioquímica. O valor é dado como grama do produto por g de DCW por hora (isto é, g $gDCW^{-1}$ h^{-1})

Uma outra forma de realização da invenção diz respeito a um processo para a produção fermentativa de um ácido orgânico ou um sal ou seu derivado, processo este que compreende as etapas de:

a) incubar uma cepa bacteriana como definido em uma das reivindicações precedentes em um meio contendo uma fonte de carbono assimilável e cultivar referida cepa em uma temperatura na faixa de cerca de 10 a 60 ou 20 a 50 ou 30 a 45 °C em um pH de 5,0 a 9,0 ou 5,5 a 8,0 ou 6,0 a 7,0 na presença de dióxido de carbono; e

b) obter referido ácido orgânico ou seu sal ou derivado do meio.

Referido processo pode ser realizado descontínua ou continuamente e o curso da produção de ácido pode ser monitorado por meios convencionais, como, por exemplo, análise de HPLC ou GC.

Preferivelmente, pelo referido processo o ácido succínico (SA) é produzido, de preferência, sob condições anaeróbicas. As condições anaeróbicas podem ser estabelecidas por meio de técnicas convencionais, como, por exemplo, por desgaseificação dos constituintes do meio de reação e mantendo-se as condições anaeróbicas pela introdução de dióxido de carbono ou nitrogênio, ou misturas destes, e, opcionalmente, hidrogênio em um índice de fluxo, por exemplo, de 0,1 a 1 ou de 0,2 a 0,5 vvm.

Se apropriado, uma leve sobrepressão de 0,1 a 1,5 bar pode ser aplicada.

No referido processo, referida fonte de carbono assimilável é preferivelmente selecionada dentre glicerol, D-glicose, D-xilose, L-arabinose, D-galactose, D-manose e misturas destes, ou composições contendo pelo menos um dos referidos composto, ou é selecionada dos produtos de decomposição de amido, celulose, hemicelulose e/ou lignocelulose.

A concentração inicial da fonte de carbono assimilável é preferivelmente ajustada a um valor em uma faixa de 5 a 100 g/litro, e pode ser mantida na referida faixa durante o cultivo.

O pH do meio de reação pode ser controlado pela adição de bases adequadas como, por exemplo, NH_4OH, NH_4HCO_3, $(NH_4)_2CO_3$, NaOH, Na_2CO_3, $NaHCO_3$, KOH, K_2CO_3, $KHCO_3$, $Mg(OH)_2$, $MgCO_3$, $Mg(HCO_3)_2$, $Ca(OH)_2$, $CaCO_3$, $Ca(HCO_3)_2$, CaO, $CH_6N_2O_2$, C_2H_7N ou outras bases e misturas destas. A condição física da base pode ou ser uma solução aquosa, suspensão aquosa, gasosa ou sólida.

Condições particularmente preferidas para produzir SA são:

Fontes de carbono: Glicose, xilose ou manose e/ou glicerol (incluindo o glicerol bruto)

Temperatura: 30 a 45 °C

pH: 6,0 a 7,0, controlado por uma base conforme descrito acima, preferivelmente por uma fonte de HCO_3, tal como Na_2CO_3, $NaHCO_3$, $Mg(HCO_3)_2$, $Ca(HCO_3)_2$ ou $Mg(OH)_2$, $MgCO_3$, $Ca(OH)_2$, $CaCO_3$.

Gás fornecido: CO_2

Em outra forma de realização, a presente invenção provê um processo para a produção fermentativa de ácido succínico ou um seu sal ou derivado, processo este que compreende as etapas de:

a) incubar uma cepa bacteriana em um meio contendo pelo menos uma fonte de carbono assimilável e cultivar referida cepa sob condições que favoreçam a formação do ácido orgânico desejado;

b) obter referido ácido orgânico ou seu sal ou derivado do meio; e processo este que seja adicionalmente caracterizado pela conversão de pelo menos 28 g/litro de glicerol para pelo menos 28,1 g/litro de ácido succínico, com um coeficiente de rendimento YP/S de pelo menos 1,0 g/g, ou de >1,0 g/g, ou de >1,05 g/g, ou de >1,1 g/g, ou de >1,15 g/g, ou de >1,20 g/g, ou de >1,22 g/g, ou de >1,24 g/g, até cerca de 1,28 g/g; como, por

exemplo, um coeficiente de rendimento YP/S de pelo menos 0,6 g/g, de pelo menos 0,7 g/g, de pelo menos 0,75 g/g, de pelo menos 0,8 g/g, de pelo menos 0,85 g/g, de pelo menos 0,9 g/g, de pelo menos 0,95 g/g, de pelo menos 1,0 g/g, de pelo menos 1,05 g/g, de pelo menos 1,1 g/g, de pelo menos 1,15 g/g, de pelo menos 1,20 g/g, de pelo menos 1,22 g/g, ou de pelo menos 1,24 g/g. Por exemplo, 28 g/litro de glicerol podem ser convertidos a até cerca de 40 ou a até cerca de 35 g/litro de ácido succínico.

Em outra forma de realização, a presente invenção provê um processo para a produção fermentativa do ácido succínico ou de um seu sal ou derivado, processo este que compreende as etapas de:

a) incubar uma cepa bacteriana em um meio contendo pelo menos uma fonte de carbono assimilável e cultivar referida cepa sob condições que favoreçam a formação do ácido orgânico desejado;

b) obter o referido ácido orgânico ou seu sal ou derivado do meio;

e processo este que seja adicionalmente caracterizado pela conversão de uma fonte de carbono selecionada de sacarose, maltose, D-frutose, D-glicose, D-xilose, L-arabinose, D-galactose, D-manose e/ou glicerol, em ácido succínico, com um rendimento de produtividade específica de pelo menos 0,6 g $gDCW^{-1}$ h^{-1} de ácido succínico ou de pelo menos 0,65 ou de pelo menos 0,7 g DCW^{-1} h^{-1} de ácido succínico, ou pelo menos 0,75 g $gDCW^{-1}$ h^{-1} de ácido succínico, ou de pelo menos 0,77 g $gDCW^{-1}$ de ácido succínico.

Em outra forma de realização, a presente invenção provê um processo para a produção fermentativa do ácido succínico ou de um seu sal ou derivado, processo este que compreende as etapas de:

a) incubar uma cepa bacteriana em um meio contendo pelo menos uma fonte de carbono assimilável e cultivar referida cepa sob condições que favoreçam a formação do ácido orgânico desejado;

b) obter o referido ácido orgânico ou seu sal ou derivado do meio;

e processo este que é adicionalmente caracterizado pela conversão de uma fonte de carbono selecionada de sacarose, maltose, D-frutose, D-glicose, D-xilose, L-arabinose, D-galactose, D-manose e/ou glicerol, em ácido succínico, com um rendimento de tempo-espaço quanto ao ácido succínico de pelo menos 2,2 g/(l h); ou de pelo menos 2,5, pelo menos 2,75, pelo menos 3, pelo menos 3,25, pelo menos 3,5 ou pelo menos 3,7 g/(l*h) de ácido succínico.

Em outra forma de realização, a presente invenção provê um processo para a produção fermentativa do ácido succínico ou de um seu sal ou derivado, processo este que compreende as etapas de:

a) incubar uma cepa bacteriana em um meio contendo pelo menos uma fonte de carbono assimilável e cultivar referida cepa sob condições que favoreçam a formação do ácido orgânico desejado;

b) obter o referido ácido orgânico ou seu sal ou derivado do meio;

e processo este que é adicionalmente caracterizado pela conversão de pelo menos 28 g/litro de uma fonte de carbono selecionada de sacarose, maltose, D-frutose, D-glicose, D-xilose, L-arabinose, D-galactose, D-manose e/ou glicerol, em ácido succínico, com um rendimento de tempo-espaço quanto ao ácido succínico de pelo menos 2,2 g/(l h); ou de pelo menos 2,5, pelo menos 2,75, pelo menos 3, pelo menos 3,25, pelo menos 3,5 ou pelo menos 3,7 g/(l*h).

Em outra forma de realização, a presente invenção provê um processo para a produção fermentativa de ácido succínico ou de um seu sal ou derivado, processo este que compreende as etapas de:

a) incubar uma cepa bacteriana em um meio contendo pelo menos uma fonte de carbono assimilável e cultivar referida cepa sob

condições que favoreçam a formação do ácido orgânico desejado;

b) obter o referido ácido orgânico ou seu sal ou derivado do meio;

e processo este que é adicionalmente caracterizado pela conversão de uma fonte de carbono selecionada de sacarose, maltose, D-frutose, D-glicose, D-xilose, L-arabinose, D-galactose, D-manose e/ou glicerol, em ácido succínico, com um rendimento de produtividade específica de pelo menos 0,6 g $gDCW^{-1}$ h^{-1} de ácido succínico ou de pelo menos 0,65 ou de pelo menos 0,7 g $gDCW^{-1}$ h^{-1} de ácido succínico, ou de pelo menos 0,75 g $gDCW^{-1}$ h^{-1} de ácido succínico, ou de pelo menos 0,77 g $gDCW^{-1}$ h^{-1} de ácido succínico, e um rendimento de tempo-espaço quanto ao ácido succínico de pelo menos 2,2 g/(l h); ou de pelo menos 2,5, pelo menos 2,75, pelo menos 3, pelo menos 3,25, pelo menos 3,5 ou pelo menos 3,7 g/(l*h).

Em outra forma de realização dos processos identificados acima de produção de ácido succínico, a fonte de carbono é o glicerol ou uma mistura de glicerol e pelo menos uma outra fonte de carbono selecionada de sacarose, maltose, D-frutose, D-galactose, D-manose, D-glicose, D-xilose e L-arabinose.

Outras condições preferidas serão deriváveis dos exemplos e figuras anexas.

O ácido succínico e/ou os sais de ácido succínico produzidos podem ser isolados de maneira convencional por métodos conhecidos na técnica, como, por exemplo, a cristalização, filtração, eletrodiálise, cromatografia. Por exemplo, eles podem ser isolados pela precipitação como um produto de succinato de cálcio no fermentador durante a fermentação, mediante o uso de hidróxido de cálcio, óxido, carbonato ou hidrogencarbonato para neutralização e filtração do precipitado.

O produto de ácido succínico desejado é recuperado do cálcio precipitado ou do succinato mediante acidificação do succinato com ácido

sulfúrico, seguido por filtração para remover o sulfato de cálcio (gesso) ou seus precipitados. A solução resultante pode ser ainda purificada por meio de cromatografia de troca de íons de modo a remover os íons residuais indesejáveis.

Outra forma de realização da invenção diz respeito a um processo para a produção do ácido succínico e/ou dos sais de ácido succínico, em particular os sais de amônio, método este que compreende a produção fermentativa do ácido succínico como definido acima e o controle do pH com uma base adequada, em particular uma base inorgânica, como amônia, ou uma sua solução aquosa.

Outra forma de realização da invenção diz respeito a um processo para a produção de tetraidrofurano (THF) e/ou 1,4-butanodiol (BDO) e/ou gama-butirolactona (GBL), o qual compreende:

a) a produção fermentativa do ácido succínico e/ou dos sais de ácido succínico, por exemplo sais de amônio conforme definido acima, e

b1) ou a hidrogenação catalítica direta do ácido livre obtido em THF, e/ou BDO e/ou GBL ou

b2) a esterificação química do ácido succínico livre obtido e/ou dos sais de amônio de ácido succínico, em seu éster dialquílico inferior correspondente e subsequente hidrogenação catalítica do referido éster em THF e/ou BDO e/ou GBL.

A alquila inferior preferivelmente representa uma alquila C_1-C_6 de cadeia reta, ou ramificada, preferivelmente resíduos de alquila C_1-C_4, em particular metila, etila, n-propila, isopropila, n-butila, sec-butila, isobutila, terc-butila, bem como n-pentila e n-hexila e seus análogos ramificados.

Outra forma de realização da invenção diz respeito a um processo para a produção de pirrolidonas, o qual compreende:

a) a produção fermentativa dos sais de amônio de ácido succínico como definido acima, e

b) a conversão química dos sais de amônio de ácido succínico em pirrolidonas de uma maneira por si conhecida, por exemplo como descrito na WO-A-2006/066839 (cujo documento é aqui incorporado como referência).

Em uma forma de realização preferida, o referido glicerol, que é usado como fonte de carbono assimilável, é glicerol bruto.

MAIS DETALHES SOBRE A HIDROGENAÇÃO DIRETA DO SA.

Condições experimentais adequadas para realizar a hidrogenação catalítica direta são bem conhecidas e, por exemplo, descritas na U.S. 4.550.185, aqui incorporada como referência.

O SA é hidrogenado de uma maneira por si conhecida com o uso de processos, aparelho e auxiliares tais como solventes familiares à pessoa habilitada na técnica. Em particular, uma hidrogenação de fase líquida contínua ou em bateladas é realizada na presença de um catalisador heterogêneo adequado para a hidrogenação ácida. Os parâmetros ótimos do processo podem ser estabelecidos pela pessoa habilitada na técnica, sem esforços inaceitáveis. Por exemplo, a temperatura de reação situa-se na faixa de cerca de 100 a cerca de 300 °C, preferivelmente na faixa de cerca de 130 a 285 °C, e a pressão é de cerca de 20 a 350 bar, por exemplo de 100 a 250 bar. Catalisadores utilizáveis para a reação de hidrogenação são conhecidos da pessoa habilitada na técnica. Por exemplo, vários catalisadores de paládio/rênio/carbono podem ser usados. Solventes utilizáveis para a reação de hidrogenação são conhecidos da pessoa habilitada na técnica. Por exemplo, um meio de solvente aquoso pode ser usado.

MAIS DETALHES SOBRE A ESTERIFICAÇÃO DO SA SEGUIDA POR HIDROGENAÇÃO:

Condições experimentais adequadas para realizar a esterificação química, seguidas pela hidrogenação catalítica direta, são bem

conhecidas e, por exemplo, descritas no pedido de Patente Européia 06007118.0, aqui incorporada como referência.

a) Processo de esterificação:

O processo de esterificação que pode compreender uma destilação reativa pode ser realizado com o uso de um aparelho por si conhecido, em várias configurações.

Por exemplo, uma usina de esterificação que seja operada em modo contínuo pode ser usada, a qual compreenda uma coluna de retificação com um número apropriado de estágios teóricos obtidos pela instalação de bandejas ou embalagens. A carga aquosa compreendendo o sal de amônio de SA, é alimentada em cima da coluna de um vaso reservatório tão logo um perfil de temperatura de estado estacionário tenha sido formado na coluna como um resultado da alimentação do alcanol que é evaporado na alça do evaporador aderente ao coletor da coluna. A reação forma um fluxo em contracorrente de líquido e condensado contendo sal de amônia, descendente, e a fase de vapor ascendente contendo alcanol. Para catalisar a reação de esterificação, um catalisador heterogênio pode ser provido nos internos da coluna. O éster carboxílico formado é líquido sob as condições do processo e passa através da extremidade inferior da coluna dentro do coletor da coluna de destilação, e é continuamente removido do coletor. Os componentes gasosos, por exemplo as misturas azeotrópicas compreendendo alcanol-água e/ou amônia, são removidos da coluna de reação e consequentemente do equilíbrio de reação do topo da coluna.

Outras modificações das formas de realização específicas acima descritas podem ser implementadas pela pessoa habilitada na técnica, sem esforço inaceitável.

Faixas paramétricas adequadas do processo para o processo de esterificação de acordo com a invenção, podem ser determinadas facilmente pela pessoa habilitada na técnica, dependendo da configuração do aparelho

usado, por exemplo o tipo dos internos usados da coluna, do tipo e da quantidade dos reagentes, do tipo e da quantidade do catalisador usado, se apropriado. Por exemplo, sem que se fique restrito a isso, os parâmetros individuais podem ser estabelecidos dentro das seguintes faixas paramétricas:

Temperatura da coluna: 0 a 300 °C, em particular 40 a 250 °C, ou 70 a 200 °C;

Pressão: de 0,1 a 6 bar, em particular a pressão padrão;

Tempo de permanência: uns poucos segundos (por exemplo de 1 a 60) até dias (por exemplo de 1 a 5), em particular de uns poucos minutos (por exemplo de 1 a 60) até umas poucas horas (por exemplo de 1 a 15), mais preferível de uns poucos minutos (por exemplo de 5 a 20) a 2 horas.

b) Processo de hidrogenação

Os ésteres de SA preparados de acordo com a invenção são hidrogenados de uma maneira por si conhecida, com o uso de processos, aparelhos e auxiliares, tais como os catalisadores, familiares à pessoa habilitada na técnica.

Em particular, uma hidrogenação de fase gasosa contínua ou em bateladas é realizada na presença de um catalisador heterogêneo adequado para a hidrogenação do éster. Os parâmetros ótimos do processo podem ser estabelecidos pela pessoa habilitada na técnica, quanto ao éster particular, sem o esforço inaceitável. Por exemplo, a temperatura de reação situa-se na faixa de cerca de 100 a cerca de 300 °C, preferivelmente na faixa de cerca de 200 a 280 °C, e a pressão é de cerca de 5 a 100 bar, por exemplo de 10 a 50 bar. A relação molar do reagente para hidrogênio é estabelecida dentro da faixa de cerca de 1:100 a cerca de 1:2000, por exemplo de 1:800 a 1:1500.

Catalisadores utilizáveis para a reação de hidrogenação da invenção são conhecidos da pessoa habilitada na técnica. Por exemplo, vários catalisadores de cobre podem ser usados. A técnica anterior descreve, por exemplo, o uso de catalisadores de cromita de cobre reduzida que são

obteníveis sob o nome 85/1 da Davy Process Technology Ltd., Inglaterra. No entanto, catalisadores particularmente adequados de acordo com a invenção são os catalisadores suportados de óxido de cobre, o óxido de cobre sendo aplicado aos materiais de suporte de alumina ou de sílica. Os exemplos da hidrogenação dos ésteres succínicos no BDO (1,4-Butanodiol) /GBL (gama-butirlactona) / THF com catalisadores de cobre, são também descritos na seguinte tese: Schlander, Janeiro, Fevereiro de 2000, University of Karlsruhe, "*Gasphasenhydrierung von Maleinsauredimethylester zu 1,4-Butandiol, gamma-Butyrolacton und Tetrahydrofuran an Kupfer-Katalysatoren*".

Mais Detalhes Sobre As Etapas De Fermentação

Uma fermentação, como usada de acordo com a presente invenção, pode ser realizada em fermentadores agitados, colunas de bolha e reatores de laço. Uma vista geral compreensiva dos possíveis tipos de métodos, incluindo os tipos de agitador e os projetos geométricos, podem ser encontrados em "*Chmiel: Bioprozesstechnik: Einführung in die Bioverfahrenstechnik, Band 1*". No processo, as variantes típicas disponíveis são as seguintes variantes conhecidas daqueles habilitados na técnica, ou explanadas, por exemplo, em "Chmiel, Hammes e Bailey: *Biochemical Engineering*", tais como a fermentação em batelada, batelada alimentada, batelada alimentada repetida ou mesmo contínua, com e sem reciclagem da biomassa. Dependendo da cepa de produção, purga com ar, oxigênio, dióxido de carbono, hidrogênio, nitrogênio ou misturas gasosas apropriadas, pode/deve ser efetuada de modo a se obter bons rendimentos.

Antes da conversão química no caldo de fermentação no processo de acordo com a invenção, o caldo de fermentação pode ser pré-tratado; por exemplo, a biomassa do caldo pode ser removida. Os processos para remover a biomassa são conhecidos daqueles habilitados na técnica, por exemplo filtração, sedimentação e flutuação. Consequentemente, a biomassa pode ser removida, por exemplo, com centrífugas, separadores, decantadores,

filtros ou em aparelhos de flutuação. Para a recuperação máxima do produto de valor, a lavagem da biomassa é frequentemente recomendável, por exemplo na forma de uma diafiltração. A seleção do método é dependente do conteúdo de biomassa no caldo fermentador e das propriedades da biomassa, e também da interação da biomassa com o produto de valor. Em uma forma de realização, o caldo de fermentação pode ser esterilizado ou pasteurizado.

Em uma outra forma de realização, o caldo de fermentação é concentrado. Dependendo da necessidade, esta concentração pode ser feita em bateladas ou continuamente. A pressão e a faixa de temperatura devem ser selecionadas de tal modo que primeiramente nenhum dano ao produto ocorra, e em segundo lugar o uso mínimo do aparelho e de energia é necessário. A seleção cuidadosa dos níveis de pressão e de temperatura para uma evaporação de múltiplos estágios permite, em particular, a economia de energia.

Em termos de aparelhagem, tanques agitados, evaporadores de película em queda, evaporadores de película fina, evaporadores de circulação de descarga forçada, e outros tipos de evaporadores, podem ser utilizados no modo de circulação natural ou forçada.

Consequentemente, a expressão "caldo de fermentação" é entendida como significando uma solução aquosa que se baseie em um processo fermentativo e não tenha sido processada, ou tenha sido processada, por exemplo, como aqui descrito.

A presente invenção será descrita em maiores detalhes por meio dos seguintes exemplos. Os seguintes exemplos se destinam a fins ilustrativos e não intentam limitar o escopo da invenção.

EXEMPLO 1

ISOLAMENTO DO DD1

Para o isolamento, uma abordagem de quatro etapas foi usada, compreendendo as etapas de amostragem, cultivo de enriquecimento,

isolamento de culturas puras e teste de culturas puras para a produção de ácido succínico (SA).

1. ABORDAGEM EXPERIMENTAL

1.1. AMOSTRAGEM

Amostras foram obtidas do rúmen bovino, suspensão foi digerida de uma usina de águas municipais servidas e bagaços, o resíduo da produção de vinho. Estes habitats são caracterizados por concentrações relativamente elevadas de substâncias orgânicas e uma atmosfera rica em CO_2 sem oxigênio. Informações mais detalhadas sobre as amostras, sua origem e manipulação são dadas abaixo.

a) O conteúdo de rúmen foi retirado de uma vaca Holstein canulada no Institut für Tierernährung, Universidade de Hohenheim. O pH *in situ* e a temperatura foram de 6,7 e 37 °C, respectivamente. O material foi filtrado através de pano de filtro estéril, gaseificado com CO_2 e imediatamente esfriado sobre gelo para o transporte, e processado no mesmo dia.

b) A suspensão digerida foi retirada da torre de digestão da usina municipal de águas servidas em Mannheim-Sandhofen. O pH *in situ* e a temperatura foram de 6,7 e de 37 °C, respectivamente. As amostras foram esfriadas em gelo e processadas no mesmo dia. Os componentes principais da fase gasosa na suspensão são o metano e o dióxido de carbono.

c) As amostras de bagaço foram coletadas em novembro de 2005 de um campo no sudoeste da Alemanha. O bagaço de uvas vermelhas (*Spätburgunder*) foi retirado do interior de uma grande roça. Esta zona deve ser anaeróbica. o bagaço de uvas brancas (Müller-Thurgau) foi retirado de um recipiente de armazenagem em que a fermentação alcoólica já estava em andamento.

1.2. CULTURAS DE ENRIQUECIMENTO

As culturas de enriquecimento foram realizadas em diferentes meios contendo D-glicose, D-xilose e L-arabinose como a única fonte de

carbono. A composição dos meios é descrita abaixo:

Tabela 1

Composição média para cultivos de enriquecimento

Composto	Concentração (g/litro)
Fonte C[a]	15
Extrato de levedura Bacto (Becton Dickinson)	5
Peptona Bacto (Becton Dickinson)	5
$(NH_4)_2SO_4$	1
$CaCl_2*2H_2O$	0,2
$MgCl_2*6H_2O$	0,2
NaCl	1
K_2HPO_4	3
L-Cisteína (agente redutor)	0,24
$MgCO_3$[b]	15
Lasalocida[c]	16 mg/litro
Monensina[c]	10 mg/litro
Anfotericina B[d]	2,5 mg/litro
Líquido de rúmen (opcional)[e]	5
Extrato de suspensão digerida (opcional)[f]	10
Extrato de bagaço (opcional)[f]	10
Bacto-Ágar (para meios sólidos apenas)	12

[a] D-glicose, D-xilose ou L-arabinose

[b] $MgCO_3$ (Riedel-de Haen, número do produto: 13117 por Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze, Alemanha).

[c] Solução de estoque em etanol.

[d] Solução de estoque em sulfóxido de dimetila

[e] O líquido de rúmen foi centrifugado. O sobrenadante foi filtrado de forma estéril, o filtrado estéril foi adicionado aos testes de enriquecimento com o conteúdo de rúmen como inóculo.

[f] 10 g de suspensão digerida ou bagaço foram misturados com 25 ml de água destilada e agitados intensivamente por 15 minutos. As partículas brutas foram separadas com o uso de um rendilhado de filtragem. As suspensões foram filtradas de forma estéril, os filtrados estéreis foram adicionados aos respectivos testes de enriquecimento.

$MgCO_3$ e água (0,75 g e 40 ml) foram autoclavados em frascos de soro de 100 ml (121 °C, 20 minutos). Extrato de levedura, peptona, fonte-C, NH_4SO_4 e K_2HPO_4 foram todos separadamente autoclavados. Quanto aos cloretos de Ca, Mg e Na, uma solução de estoque foi preparada, a qual foi

autoclavada. Para garantir que nenhum oxigênio estivesse presente, os seguintes procedimentos padrão foram usados:

- Meios de cultivo foram gaseificados com CO_2 livre de oxigênio e estéril após a autoclavagem.
- Uma caixa anaeróbica (Meintrup DWS Laborgeräte GmbH, Lähden-Holte, Alemanha) foi usada para experiências que tinham de ser realizadas sob condições anaeróbicas.
- A incubação das placas de ágar ocorreu em jarras anaeróbicas. Para garantir condições anaeróbicas, Anaerocult® A (Merck) foi usado.

Amostras de rúmen e suspensão digerida foram usadas não diluídas como inóculo. 50 g de bagaço sólido foram diluídos em 100 ml de solução de NaCl a 0,9 %, filtrados para remover as partículas brutas e depois usados como inóculo.

Frascos de soro de 100 ml (Zscheile & Klinger, Hamburgo, Alemanha) foram enchidos com 50 ml de meio e 2 ml do inóculo respectivo, fechadas com rolhas de borracha butílica (Ochs GmbH; Bovenden/Lenglem, Alemanha) e gaseificadas com CO_2. Uma sobrepressão de cerca de 0,8 bar foi ajustada. As frascos foram incubadas em uma incubadora de agitação (160 rpm, diâmetro de agitação: 2,5 cm) em 37 °C.

O consumo de glicose, xilose e arabinose e a formação de ácido succínico e subprodutos foram quantificados através de análises de HPLC dos sobrenadantes livres de células não diluídas do caldo de cultivo, com o uso da detecção RI. Amostras de caldo foram retiradas com uma seringa estéril através da rolha de borracha butílica, a separação celular foi realizada por filtração (0,22 μm). Uma Coluna Aminex HPX-87 H (Biorad) de dimensões internas de 300 x 7,8 mm e 5 mm de H_2SO_4 foram usados como fase estacionária e móvel, respectivamente. A temperatura da coluna foi de 30 °C, o índice de fluxo foi de 0,5 ml $min.^{-1}$.

1.3. ISOLAMENTO DAS CULTURAS PURAS

O isolamento das culturas puras dos cultivos de enriquecimento foi obtido por estrias repetidas sobre as placas de ágar.

1.4. TESTE DAS CULTURAS PURAS PARA PRODUÇÃO DE ÁCIDO SUCCÍNICO

As culturas puras foram testadas em cultura líquida para a produção de SA. O consumo de açúcar e a formação de SA e de produtos colaterais foram quantificados por HPLC. As condições de cultivo e de HPLC foram as mesmas como aquelas descritas na seção acima 'Cultivo de enriquecimento'.

2. RESULTADOS

2.1 CONDIÇÕES DE ENRIQUECIMENTO RECOMENDADAS

A seguinte tabela resume aquelas condições experimentais que são recomendáveis para o enriquecimento dos geradores de ácido succínico (SA).

TABELA 2

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS RECOMENDADAS PARA A PRODUÇÃO DOS GERADORES DE SA

	Conteúdo de rúmen	Suspensão digerida	Bagaço
Fonte C	L-arabinose	L-arabinose[a]	D-glicose, L-arabinose
Tampão	$MgCO_3$	$MgCO_3$	$MgCO_3$
Antibióticos	lasalocida, monensina	lasalocida, monensina	anfotericina B
Tempo de Incubação	< 16 h	< 24 h	< 50 h

[a] glicose e xilose não foram testadas nos testes com a suspensão digerida.

Quanto ao enriquecimento dos geradores de SA do conteúdo de rúmen, a melhor fonte C é a arabinose (Culturas de geração 3/3 apresentando produção de SA, 0/3 com glicose, 2/3 com xilose). Os resultados são resumidos na tabela a seguir. A adição dos antibióticos ionofóricos lasalocida e monensina ao meio de enriquecimento resultou na produção de SA substancialmente mais elevada (1,9 a 5,4 vs. 09 s 1,2 g/litro

em 17 horas) e produção inferior de ácido láctico e propiônico. Estes resultados, portanto, confirmam que os microorganismos geradores de SA podem ser de fato favorecidos pela adição destes compostos ao meio de enriquecimento (Lee *et al.*, 2002a). As culturas de enriquecimento tamponadas com $MgCO_3$ apresentaram produção de ácido succínico mais elevada do que nos testes com TRIS (1,9 a 5,4 vs. 1,2-1,4 g/litro em 17 horas). Presumivelmente isto é causado pela i) capacidade mais elevada do tampão de $MgCO_3$, ii) seu estresse osmótico inferior por causa da menor solubilidade, e iii) liberação do CO_2 do íon de carbonato, o qual é necessário para a biossíntese do SA.

Tabela 3 Resultados Das Culturas De Enriquecimento Quanto Aos Geradores De SA Do Conteúdo De Rúmen

exp no	*tempo de inc.* [h]	*fonte-C*	*Tampão*	*antibióticos*	*Agente redut.*	*fonte-C* [g/L]	*succínico* [g/L]	*láctico* [g/L]	*fórmico* [g/L]	*acético* [g/L]	*propiônico* [g/L]	*etanol* [g/L]
1	24	glicose	$MgCO_3$	-	-	0,0	0,0	3,7	0,6	2,8	0,0	0,0
2	24	glicose	$MgCO_3$	-	-	0,0	0,0	3,6	0,4	2,7	0,0	0,0
3	24	glicose	$MgCO_3$	-	-	0,0	0,0	3,9	0,4	2,6	0,0	0,0
4	24	xilose	$MgCO_3$	-	-	0,0	2,3	3,8	0,2	5,7	0,0	0,0
5	24	xilose	$MgCO_3$	-	-	0,0	0,0	3,4	0,0	2,7	0,5	0,0
6	24	xilose	$MgCO_3$	-	-	0,0	1,8	3,4	0,0	2,7	0,0	0,0
7	17	arabinose	$MgCO_3$	-	-	1,4	0,9	7,6	0,0	1,3	1,0	0,0
8	17	arabinose	$MgCO_3$	-	-	1,9	0,9	7,4	0,0	1,3	1,0	0,0
9	17	arabinose	$MgCO_3$	-	-	1,2	1,2	6,8	0,0	1,5	1,2	0,0
10	17	arabinose	$MgCO_3$	las+mon	-	1,5	3,3	0,4	3,8	3,7	0,0	2,8
11	17	arabinose	$MgCO_3$	las+mon	-	0,4	1,9	1,8	3,8	3,7	0,0	3,3
12	17	arabinose	$MgCO_3$	las+mon	-	2,4	5,4	0,0	2,9	3,6	0,0	1,8
13	17	arabinose	TRIS	las+mon	-	7,2	1,2	1,3	0,0	1,4	0,4	1,5
14	17	arabinose	TRIS	las+mon	-	8,0	1,4	1,3	0,0	1,3	0,4	1,4
15	17	arabinose	TRIS	las+mon	-	8,8	1,4	1,2	0,0	1,1	0,3	1,2

Quanto ao enriquecimento dos geradores de SA da suspensão digerida, a única fonte C testada foi a arabinose. Os resultados são resumidos na tabela a seguir. Estas experiências indicaram que tempos de incubação curtos de 24 horas ou inferiores, são necessários para impedir a depleção do substrato e o consumo de SA, presumivelmente pelas bactérias geradoras do ácido propiônico:

succinato^{2-} + $H_2O \rightarrow$ propionato + HCO_3 (Janssen, 1991).

Tabela 4 Resultados Das Culturas De Enriquecimento Para Os Geradores De SA Da Suspensão Digerida

exp no	*tempo de inc.* [h]	*fonte-C*	*Tampão*	*antibióticos*	*Agente redut.*	*fonte-C* [g/L]	*succínico* [g/L]	*láctico* [g/L]	*fórmico* [g/L]	*acético* [g/L]	*propiônico* [g/L]	*etanol* [g/L]
1	8	arabinose	$MgCO_3$	las+mon	-	13,3	0,2	0,1	0,2	0,2	0,0	1,1
2	8	arabinose	$MgCO_3$	las+mon	-	13,4	0,2	0,1	0,2	0,2	0,0	1,1
3	8	arabinose	$MgCO_3$	las+mon	-	13,1	0,2	0,1	0,2	0,2	0,0	1,1
1	24	arabinose	$MgCO_3$	las+mon	-	0,0	1,6	1,2	3,5	3,9	0,4	3,5
2	24	arabinose	$MgCO_3$	las+mon	-	0,0	1,6	1,3	3,4	4,0	0,4	3,5
3	24	arabinose	$MgCO_3$	las+mon	-	0,0	1,7	1,3	3,1	3,8	0,4	3,4
1	30	arabinose	$MgCO_3$	las+mon	-	0,0	0,0	1,3	3,4	4,0	1,4	3,1
2	30	arabinose	$MgCO_3$	las+mon	-	0,0	0,9	1,4	3,4	4,1	0,9	3,2
3	30	arabinose	$MgCO_3$	las+mon	-	0,0	0,0	1,4	3,0	4,0	1,4	3,1

Os resultados obtidos nas culturas de enriquecimento do bagaço são resumidos na tabela a seguir. O enriquecimento dos geradores de SA a partir do bagaço era apenas bem sucedido se o bagaço das uvas vermelhas (tipo Spatburgunder) fosse usado. É absolutamente necessário adicionar anfotericina B ao meio de enriquecimento para suprimir a produção de etanol, presumivelmente causada pelas leveduras do vinho. A glicose e a arabinose foram ambas fontes C adequadas, mas a xilose não o foi. Os tempos de incubação que foram necessários para inequivocamente detectar a produção de SA foram substancialmente mais elevados do que com o material de amostra do rúmen e da suspensão digerida.

Tabela 5 Resultados das culturas de enriquecimento para os geradores de SA do bagaço

exp no	*tipo de uva* [a]	*- tempo de inc.* [h]	*fonte-C*	*Tampão*	*antibióticos*	*Agente vermelhaut.*	C-source [g/L]	*succínico* [g/L]	l *láctico* [g/L]	*fórmico* [g/L]	*acético* [g/L]	*etanol* [g/L]
1	vermelha	59	glicose	$MgCO_3$	las+mon	L-cisteína	10,8	0,0	0,0	0,0	0,1	2,0
2	vermelha	59	glicose	$MgCO_3$	las+mon	L-cisteína	10,8	0,0	0,0	0,0	0,1	2,0
3	vermelha	59	xilose	$MgCO_3$	las+mon	L-cisteína	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0	1,6
4	vermelha	59	xilose	$MgCO_3$	las+mon	L-cisteína	12,7	0,1	0,1	0,0	0,0	1,5
5	vermelha	59	arabinose	$MgCO_3$	las+mon	L-cisteína	13,4	0,1	0,1	0,0	0,0	1,6
6	vermelha	59	arabinose	$MgCO_3$	las+mon	L-cisteína	13,3	0,0	0,1	0,0	0,0	1,5
7	branca	59	glicose	$MgCO_3$	las+mon	L-cisteína	0,0	0,0	0,0	0,0	0,6	6,2
8	branca	59	glicose	$MgCO_3$	las+mon	L-cisteína	0,1	0,0	0,0	0,0	0,6	5,9
9	branca	59	xilose	$MgCO_3$	las+mon	L-cisteína	12,8	0,0	0,2	0,0	0,0	1,5
10	branca	59	xilose	$MgCO_3$	las+mon	L-cisteína	13,0	0,0	0,2	0,0	0,0	1,6
11	branca	59	arabinose	$MgCO_3$	las+mon	L-cisteína	13,3	0,0	0,2	0,0	0,1	1,7
12	branca	59	arabinose	$MgCO_3$	las+mon	L-cisteína	13,4	0,0	0,2	0,0	0,1	1,8
13	vermelha	50	glicose	$MgCO_3$	anfot. B	L-cisteína	4,4	0,0	1,1	1,3	2,7	1,3
14	vermelha	50	glicose	$MgCO_3$	anfot. B	L-cisteína	0,0	6,9	0,0	0,3	3,2	0,4
15	vermelha	50	xilose	$MgCO_3$	anfot. B	L-cisteína	0,9	0,0	3,7	3,7	2,5	1,9
16	vermelha	50	xilose	$MgCO_3$	anfot. B	L-cisteína	5,9	0,0	1,8	1,8	2,5	1,2
17	vermelha	50	arabinose	$MgCO_3$	anfot. B	L-cisteína	13,5	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0
18	vermelha	50	arabinose	$MgCO_3$	anfot. B	L-cisteína	6,2	4,5	0,0	0,3	2,6	0,2
19	branca	48	glicose	$MgCO_3$	anfot. B	L-cisteína	0,0	0,0	3,8	2,1	2,9	1,6
20	branca	48	glicose	$MgCO_3$	anfot. B	L-cisteína	0,0	0,0	3,7	1,7	5,5	1,8
21	branca	48	xilose	$MgCO_3$	anfot. B	L-cisteína	7,5	0,0	1,1	2,3	2,4	1,9
22	branca	48	xilose	$MgCO_3$	anfot. B	L-cisteína	6,8	0,0	0,7	0,0	4,4	0,8
23	branca	48	arabinose	$MgCO_3$	anfot. B	L-cisteína	6,2	0,0	0,6	0,2	2,8	1,2
24	branca	48	arabinose	$MgCO_3$	anfot. B	L-cisteína	0,3	0,0	2,4	3,5	3,8	3,5

[a] *vermelha = bagaço de uvas vermelhas (tipo Spätburgunder) como inóculo; branca = bagaço de uvas brancas (Müller-Thurgaiu) como inóculo.*

2.2. MELHORES RESULTADOS DAS EXPERIÊNCIAS DE ENRIQUECIMENTO

Os melhores resultados obtidos nas culturas de enriquecimento para os geradores de SA acham-se listados na Tabela 6 a seguir.

Tabela 6 Melhores Resultados Nas Culturas De Enriquecimento Quanto Aos Geradores De Ácido Succínico

Material da amostra	*Rúmen*	*Suspensão digerida*	*Bagaço*
fonte C	L-arabinose	L-arabinose	L-arabinose
SA [g/L]	7,1	6,9	8,4
STY [g/(L h)][a]	0,2	0,4	0,1
rendimento [g/g][a]	0,5	0,5	0,6

[a] Rendimento de tempo-espaço e rendimento quanto ao ácido succínico.

Referida tabela indica que, com cada um dos três materiais de amostra, é possível receber as culturas de enriquecimento geradoras de ácido succínico. As culturas de enriquecimento que se originam da suspensão digerida apresentaram rendimentos em tempo-espaço mais elevados do que aquelas do rúmen e do bagaço (0,4 vs. 0,2 e 0,1 g/[l h]). Entretanto, os isolados produtores do SA foram exclusivamente obtidos das culturas de enriquecimento produtoras do SA com material do rúmen como inóculo. Aparentemente, o isolamento dos geradores de SA da suspensão digerida e do bagaço requer estratégias mais sofisticadas.

2.3. ISOLADOS GERADORES DO ÁCIDO SUCCÍNICO

Os melhores isolados (= culturas puras) que apresentam produção de SA em experiências de cultura pura, e suas características, são resumidos na tabela a seguir. A mais elevada concentração de SA (8,8 g/litro) e o rendimento de tempo-espaço (0,6 g/[l h]) foram obtidos com DD1, um isolado do rúmen.

Tabela 7 características dos melhores isolados produtores do ácido succínico (sa).

Isolado	DD1	DD1[a]	DD2
origem	*rúmen*	*rúmen*	*rúmen*
fonte-C, enr.[b]	L-arabinose	L-arabinose	L-arabinose
fonte-C, pura[b]	L-arabinose	*D-glicose*	L-arabinose
SA [g/L]	8,8	7,3	3,5
STY [g/(L h)][c]	0,6	0,5	0,1
Rendimento [g/g][c]	0,6	0,5	0,3
Subprodutos [g/L]			
- *ácido fórmico*	3,3	3,7	-
- *ácido acético*	4,5	4,2	2,7
- *ácido láctico*	-	-	1,5
- *etanol*	-	-	2,7

[a] O isolado DD1 foi testado duas vezes em cultura pura, uma vez com glicose e uma vez com arabinose.

[b] Fonte-C, enr. = fonte-C durante o enriquecimento; fonte-C, pura = fonte-C durante a experiência de cultura pura.

[c] Rendimento de tempo-espaço e rendimento quanto ao ácido succínico.

3. CONCLUSÃO

O procedimento estabelecido é adequado ao enriquecimento dos geradores de SA do rúmen, da suspensão digerida e do bagaço. Entretanto, os isolados geradores do SA foram exclusivamente obtidos de culturas de enriquecimento de geradores de SA com material do rúmen como inóculo. O isolado mais promissor é a bactéria DD1 do rúmen. Ela usa glicose e arabinose para a produção do SA. Sob condições não otimizadas ainda, quase 9 g/litro de SA são produzidos de 15 g/litro de arabinose. A Figura 4 mostra uma imagem do DD1 tomada com um microscópio óptico.

Exemplo 2 Preparação Do Banco Celular De Dd1

1. Preparação dos meios

A composição dos meios de cultura é descrita na Tabela 8.

Tabela 8 Composição De Meios Sólidos E Líquidos Para O Preparo Dos Bancos Celulares De Dd1

Composto	Concentração (g/litro)	Concentração da solução de estoque (g/litro)
Glicose	variável[a]	650
Extrato de levedura Bacto (Becton Dickinson)	5	-
Peptona polipeptona (Becton Dickinson)	5	-
$(NH_4)_2 SO_4$	1	500
$CaCl_2*2H_2O$	0,2	20
$MgCl_2*6H_2O$	0,2	20
NaCl	1	100
K_2HPO_4	3	500
$MgCO_3$	variável[b]	-
Bacto-Agar (apenas para meios sólidos)	12	

[a] As concentrações da glicose foram de 15 g/litro (em placas) e de 20 ou 50 g/litro (em meios líquidos).

[b] As concentrações de $MgCO_3$ (Riedel-de Haen, produto número: 13117 pela Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH) foram de 5 g/litro (em placas) e de 0 a 30 g/litro (em meios líquidos)

5 g de extrato de levedura, 5 g de peptona, $MgCO_3$ e (para meios sólidos) 12 g de Bacto-Agar foram misturados em 900 ml de água destilada e autoclavados (20 minutos). Após o esfriamento até cerca de 65 °C, os componentes que faltavam foram adicionados como soluções de estoque estéreis. Glicose, sulfato de amônio e K_2HPO_4 foram todos separadamente autoclavados. Cloretos de Ca, Mg e Na foram autoclavados juntos.

2. Preparação de MCB

Duas placas de ágar recentes foram inoculadas com DD1 e incubadas em 37 °C em uma jarra anaeróbica (Anaerocult A, Merck) durante a noite. A biomassa foi retirada das placas e recolocada em suspensão no meio líquido livre de $MgCO_3$ com 20 g/litro de glicose para ajustar a $OD_{600} \approx 1,0$. A inoculação foi realizada com 0,5 ml desta suspensão celular. As culturas foram realizadas em frascos de soro de 100 ml com rolhas de

borracha butílica à prova de gás (Ochs GmbH, Bovenden/Lenglem, Alemanha) contendo 50 ml do meio líquido com 20 g/litro de glicose e 30 g/litro de MgCO3 e uma atmosfera de CO_2 com sobrepressão de 0,8 bar. As frascos de soro (no total de 10) foram incubadas em 37 °C, uma velocidade rotativa de 160 rpm e um diâmetro de agitação de 2,5 cm.

Para monitorar o consumo de glicose, a cultura de uma frasco foi interrompida e a amostragem e a análise de HPLC foram realizadas após 0, 3, 4, 5, 7, 8 e 8,5 horas. Após 8,5 horas (a concentração da glicose era de 3,4 g/litro) a cultura foi interrompida. Alíquotas de 0,5 ml de suspensão celular e de 0,5 ml de glicerol estéril foram colocadas em criofrascos, misturadas e armazenadas por 13 horas em -20 e, mais tarde, em -80 °C como MCB. O MCB foi testado quanto à pureza por estriagem de uma alça do último criofrasco sobre placas de ágar para o controle e verificação da contaminação na cultura líquida (meios como descritos na Tabela 8) do espectro do produto e da contaminação (mediante microscopia). As condições da HPLC foram as mesmas daquelas descritas no Exemplo 1.

3. Preparação do WCB

Um frasco do MCB foi usado para inocular uma frasco de soro de 100 ml com rolha de borracha butílica à prova de gás (ver acima) contendo 50 ml do meio líquido com 50 g/litro de glicose. A incubação foi realizada por 10 h em 37 °C em uma incubadora de agitação (velocidade de rotação de 180 rpm, diâmetro da agitação: 2,5 cm). No final da cultura, a concentração da glicose era de 20 g/litro e o pH ficou ao redor de 6,5. Os criofrascos foram enchidos com alíquotas de 0,5 ml de suspensão celular 4 0,5 ml de glicerol estéril, misturadas e armazenadas em -80 °C como WCB. As verificações da pureza foram as mesmas no que diz respeito ao MCB. As condições da HPLC foram as mesmas daquelas descritas no Exemplo 1.

Exemplo 3 Caracterização taxonômica do dd1

A caracterização taxonômica da cepa DD1 foi realizada

através da análise de rDNA 16S e 23S, a qual foi conduzida como descrito abaixo:

A extração do DNA genômico, a amplificação do rDNA 16S mediada por PCR e a purificação dos produtos da PCR foram realizadas como descrito por Rainey *et al.*, 1996. Um fragmento de DNA contendo o rDNA 23S foi amplificado pelo mesmo método, com o uso do iniciador dianteiro 5'-AGTAATAACGAACGACACAG-3' e do iniciador reverso 5'-AGCCGATTCCCTGACTAC-3'. Os produtos de PCR purificados foram sequenciados com o uso do kit CEQ®DTCS-Quick Start (Beckman Coulter) conforme orientação no protocolo do fabricante. O Sistema de Análise Genética CEQ®8000 foi usado para a eletroforese dos produtos de reação da sequências. O editor ae2 (Maidak *et al.*, 1999) foi usado para alinhar a sequência de rDNA 16S da cepa DD1 em relação àquelas do dos membros representativos da subclasse γ da *Proteobacteria* disponível dos bancos de dados das EMBL e RDP. Para a construção da árvore filogenética, os procedimentos da PHYLIP (Phylogeny Inference Package, versão 3.5c, distribuído por J. Felsenstein, Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle, USA) foram usados: distâncias evolucionárias aos pares foram calculadas com o uso do método de Jukes e Cantor (1969), a árvore filogenética foi construída destas distâncias com o uso do método de união adjacente (Saitou e Nei, 1987).

A árvore filogenética à base do rDNA 16S é apresentada na Figura 1. Com base na análise do rDNA 16S, a cepa de DD1 relativa mais próxima é a "*Mannheimia succiniciproducens*" MBEL.55E com uma similaridade de 99,8 %. Esta cepa foi isolada por cientistas do Korea Advanced Institute of Science and Technology (KAIST) do rúmen bovino (Lee *et al.*, 2002a; Lee *et al.*, 2002b). O fragmento de rDNA 23S amplificado, do DD1, foi alinhado às sequências de rDNA 23S da "*Mannheimia succiniciproducens*" MBEL 55E (sequência de genoma completo, número de

acesso AE016827) para indicar a diferença entre as cepas.

A Figura 2 mostra a sequência de rDNA 16S da cepa DD1. A Figura 3 mostra a sequência de rDNA 23S da cepa DD1 e um alinhamento ao rDNA 23S de "*Mannheimia succiniciproducens*" MBEL 55E (sequência de genoma completo, número de acesso AE016827) é mostrado no Anexo 1.

Exemplo 4 Morfologia Celular E Morfologia De Colônia Do Dd1

Um frasco do WCB (Exemplo 2) foi usado para inocular uma frasco de soro de 100 ml com rolha de borracha butílica à prova de gás (ver acima) contendo 50 ml do meio líquido com 50 g/litro de glicose (composição e preparação conforme descritas no Exemplo 2). A incubação foi realizada por 15 horas em 37 °C e 170 rpm (diâmetro de agitação: 2,5 cm). No final da cultura, a concentração da glicose havia reduzido a cerca de 17 g/litro (Medição através de HPLC, condições conforme descritas no exemplo 1). Para examinar a morfologia celular de DD1, células isoladas foram observadas com o uso da microscopia ótica. Para caracterizar a morfologia de colônia do DD1, uma alça da suspensão celular foi estriada sobre placas Brain Heart Infusion (Bacto Brain Heart Infusion, produto número: 237500 solidificado com 12 g/litro de Bacto Agar, produto número: 214010; ambos da Becton, Dickinson and Company) e incubada aeróbica e anaerobicamente (Anaerocult, A., Merck) em 37 °C.

As células de DD1 aparecem como bastões que ocorrem isoladamente, aos pares ou em cadeias curtas (ver a Figura 4). Após 24 horas de incubação, as colônias apresentavam-se circulares, brancas-amareladas, translúcidas e com 0,5 a 1 μm (crescimento aeróbico) e 1 a 2 μm (crescimento anaeróbico) de diâmetro.

Exemplo 5 Utilização das diferentes fontes-c

A utilização das diferentes fontes-C por DD1 foi testada sob as condições descritas por Lee *et al.*, 2002a.

1. Preparação dos meios

A composição do meio de cultivo é descrita na Tabela 9.

Tabela 9 Composição do meio para os testes para a utilização das diferentes fontes-c.

Composto	Concentração (g/litro)	Concentração da solução de estoque (g/litro)
fonte-C	10	250
extrato de levedura Bacto (Becton Dickinson)	5	100
Peptona polipeptona (Becton Dickinson)	10	100
$(NH_4)_2 SO_4$	2	500
$CaCl_2*2H_2O$	0,2	20
$MgCl_2*6H_2O$	0,2	20
NaCl	2	100
K_2HPO_4	3	500
$MgCO_3$ (Riedel-de Haen 13117)	10	-

O extrato de levedura, a polipeptona e o $MgCO_3$ foram autoclavados juntos. Após o esfriamento, os componentes ausentes foram acrescentados como soluções de estoque estéreis. A glicose e as outras fontes-C, sulfato de amônio e K_2HPO_4 foram todos separadamente autoclavados. Os cloretos de Ca, Mg e Na foram autoclavados juntos. Na_2S*9H_2O foi adicionado em uma concentração final de 1 mg/litro para garantir condições anaeróbicas.

2. Culturas e análises

Para desenvolver a cultura das sementes, um frasco do WCB foi usado para inocular uma frasco de soro de 100 ml com rolha de borracha butílica à prova de gases (ver acima) contendo 50 ml do meio líquido descrito na Tabela 9, mas com 20 g/litro de glicose e uma atmosfera de CO_2 com 0,8 bar de sobrepressão, a incubação foi realizada por 13 horas em 37 °C e 160 rpm (diâmetro de agitação: 2,5 cm). A suspensão celular foi centrifugada (Biofuge primo R, Heraeus,) com 5000 g por 5 minutos, e a pelota celular foi lavada e depois recolocada em suspensão em 50 ml de meio sem uma fonte de carbono e sem $MgCO_3$ para gerar um inóculo livre de glicose (todas as etapas na temperatura ambiente e na câmara anaeróbica).

As principais culturas foram cultivadas em frascos de 100 ml de soro contendo 50 ml de meio líquido com 10 g/litro do fonte-C respectiva (D-manitol, D-frutose, D-xilose, sacarose, maltose, lactose, xilitol, inositol, D-sorbitol, glicerol, L-arabinose, D-galactose ou D- manose) e uma atmosfera de CO_2 com sobrepressão de 0,8 bar. Para o teste com a utilização de glicerol, a qualidade 'Glicerol 99 %, puríss.' (Riedel-de Haen, produto número: 15523-1L-R pela Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze, Alemanha) foi usada. A inoculação foi realizada com 1,5 ml do inóculo livre de glicose. As frascos foram incubadas em 37 °C, e 160 rpm (diâmetro de agitação: 2,5 cm). A utilização da respectiva fonte-C por DD1 foi considerada como positiva quando pelo menos 3 g/litro da fonte-C foram consumidos dentro de 24 horas. Para verificar os resultados obtidos na cultura principal, 1 ml da cultura principal respectiva foi usado para inocular 50 ml de meio de cultura fresco com 10 g/litro da respectiva fonte-C. Os resultados foram, portanto, confirmados em duas culturas principais subsequentes. O consumo das fontes-C foi quantificado através de HPLC como descrito no Exemplo 1. Quando o glicerol foi medido, a temperatura da coluna foi ajustada a 50 °C para se obter uma separação suficiente de SA, ácido láctico e glicerol, os quais têm tempos de retenção semelhantes.

3. Resultados

Os resultados são resumidos na Tabela 10 a seguir.

Tabela 10 Utilização de diferentes fontes-c por dd1 e mbel 55e

Fonte-C	DD1[a]	MBEL 55E[b]
Manitol	+	+
Frutose	+	+
Xilose	+	+
Sacarose	+	+
Maltose	+	+
Lactose	+	+
Xilitol	-	-
Inositol	-	-
Sorbitol	-	-
Glicerol	+	-
Arabinose	+	ND
Galactose	+	ND
Manose	+	ND

[a] Análises quanto ao consumo de cada fonte-C após 24 horas. As culturas foram conduzidas em duplicata.

[b] dados dos resultados de Lee *et al.*, 2002a. ND = não determinado.

A referida tabela mostra que o padrão de utilização das fontes-C das duas cepas difere em relação ao glicerol. DD1 pode metabolizar o glicerol que não seja usado por MBEL 55E.

Além da sacarose, DD1 da D-glicose e da D-frutose utiliza D-xilose, L-arabinose, D galactose e D-manose. Em consequência, todos os tipos de monossacarídeos na lignocelulose (Kamm *et al.*, 2006; Lee, 1997) são utilizados por DD1. A utilização da L-arabinose, D-galactose e D-manose por MBEL55E não foi testada por Lee *et al.*, 2002a.

Exemplo 6 Formação Do Sa E Dos Subprodutos Do Glicerol E De Diferentes Hexoses E Pentoses

A produtividade do ácido succínico (SA) de DD1 sobre glicerol, D-xilose, L-arabinose, D-galactose e D-manose foi avaliada em testes de frascos de soro com 10 g/litro da respectiva fonte-C (10 g/litro de glicose, como referência).

1. Preparação do meio

A composição e o preparo dos meios de cultura foram os mesmos do Exemplo 2 (cultura de sementes) e Exemplo 5 (culturas principais).

2. Culturas e análises

O desenvolvimento da cultura de sementes no meio líquido, com 50 g/litro de glicose e 30 g/litro de $MgCO_3$ foi feito como descrito no Exemplo 2. O preparo do inóculo livre de glicose foi realizado como descrito no Exemplo 5.

O desenvolvimento das culturas principais com 10 g/litro de glicerol, sacarose, D-xilose, D-frutose, L-arabinose, D-galactose, D-manose ou D-glicose e 10 g/litro de $MgCO_3$ foi feito como descrito no Exemplo 5. O

consumo da fonte-C respectiva e a produção de SA e subprodutos, foram quantificados por HPLC como descrito no Exemplo 5.

3. Resultados

Na Tabela 11 a seguir, os resultados são resumidos.

Tabela 11 Formação Do Sa E Dos Subprodutos Do Glicerol E De Diferentes Açúcares Por Dd1

	glyc	**suc**	**gluc**	**fruc**	**xyl**	**ara**	**gal**	**man**
t_c [h][a]	9	4	4	4	6	6	6	5
Δc_{CS} [g/L][b]	-5,3	-9,8	-9,3	-9,4	-7,6	-7,8	-7,1	-8,1
Δc_{SA} [g/L][c]	+6,4	+5,8	+5,7	+4,8	+4,6	+4,9	+4,5	+4,9
Δc_{LA} [g/L][c]	0	+0,1	0	+0,4	0	0	0	0
Δc_{FA} [g/L][c]	+0,4	+2,0	+1,8	+2,3	+1,9	+1,6	+1,2	+1,8
Δc_{AA} [g/L][c]	+0,3	+2,8	+2,8	+2,8	+2,6	+2,4	+2,1	+2,7
STY [g/(L h)][d]	0,7	1,5	1,4	1,2	0,8	0,8	0,8	1,0
Rendimento [g/g][d]	1,2	0,6	0,6	0,5	0,6	0,6	0,6	0,6

[a] tempo de cultura.

[b] consumo de fonte de carbono.

[c] formação dos ácidos succínico, láctico, fórmico e acético.

[d] rendimento de tempo-espaço e produção de ácido succínico.

A Tabela 11 mostra que, em todos os casos, substanciais quantidades de SA são formadas. A produção do SA do glicerol (glyc), ao invés da sacarose (suc), D-glicose (gluc), D-frutose (fruc), D-xilose (xyl), L-arabinose (ara), D-galactose (gal) ou D-manose (man), por DD1, tem duas vantagens óbvias: 1) um rendimento substancialmente mais elevado, ii) uma formação de ácido fórmico e acético substancialmente inferior. Por outro lado, a produtividade do SA (rendimento de tempo-espaço) com glicerol é levemente menor do que com os açúcares. Entretanto, a produtividade do SA de DD1 com glicerol é substancialmente mais elevada do que o valor obtido com *Anaerobiospirillum succiniciproducens* por Lee *et al.*, 2001 (0,14 g de SA/[l h]).

Especialmente, o Rendimento substancialmente mais elevado

obtido com o glicerol é um resultado muito interessante: ele pode contribuir para uma clara redução do custo de produção para o ácido succínico fermentativo, os sais de ácido succínico e BDO/GBL/THF ou pirrolidonas dele produzidas, respectivamente - em particular, se o glicerol bruto barato das usinas de biodiesel puder ser aplicado.

Exemplo 7 Formação de sa e dos subprodutos de diferentes gliceróis brutos

A produtividade do SA de DD1 em diferentes gliceróis brutos (C1 a C3) foi avaliada em testes de frasco de soro com 10 g/litro do respectivo glicerol [10 g/litro de glicerol puro (P1) como referência].

1. Preparação do Meio

A composição do meio é descrita na Tabela 12 a seguir.

Tabela 12 Composição Do Meio Para O Teste Sobre A Formação Do Sa De Diferentes Gliceróis Brutos

Composto	Concentração (g/litro)	Concentração da solução de estoque (g/litro)
Fonte-C	variável [a]	variável
Extrato de levedura Bacto (Becton Dickinson)	5	100
Peptona Bacto (Becton Dickinson)	5	100
$(NH_4)_2 SO_4$	1	500
$CaCl_2*2H_2O$	0.2	20
$MgCl_2*6H_2O$	0.2	20
NaCl	1	100
K_2HPO_4	3	500
$MgCO_3$ (Riedel-de Haen 13117)	30	-

[a] As concentrações foram de 50 g/litro de glicose na cultura de sementes e de 10 g/litro do respectivo glicerol na cultura principal.

$MgCO_3$ e água (1,5 g e 40 ml) foram esterilizados em frascos de soro de 100 ml (121 °C, 20 minutos). Após o esfriamento, soluções estéreis separadas dos outros compostos foram adicionadas. Extrato de levedura, peptona, sulfato de amônio e K_2HPO_4 foram todos separadamente esterilizados por filtração da respectiva solução de estoque. Quanto aos

cloretos de Ca, Mg e Na, uma solução de estoque foi preparada, a qual foi esterilizada por filtração. A glicose e os diferentes glicerói s foram todos separadamente esterilizados (121 °C, 20 minutos). Para o teste de referência com glicerol puro (P1), a qualidade 'Glicerol 99 %, puriss.' (Riedel-de Haen, produto número: 15523-1L-R) pela Honeywell Specialty Chemicals Seelze GmbH, Seelze, Alemanha, foi usada.

2. Culturas e Análises

A cultura de sementes foi cultivada em uma frasco de soro de 100 ml com rolha de borracha butílica à prova de gás (ver acima) contendo 50 ml do meio descrito na Tabela 12 com 50 g/litro de glicose e uma atmosfera de CO_2 com uma sobre pressão de 0,8 bar. A inoculação foi conduzida com 1 ml do WCB (Exemplo 2). A incubação foi realizada por 15 horas em 37 °C e 170 rpm (diâmetro de agitação: 2,5 cm). No final da cultura, a concentração da glicose havia sido reduzida a cerca de 17 g/litro.

A suspensão celular foi centrifugada (Biofuge primo R, Heraeus) com 5000 g por 5 minutos, e a pelota celular foi lavada e depois recolocada em suspensão em 50 ml do meio sem glicose e sem $MgCO_3$ para gerar um inóculo livre de glicose.

As culturas principais foram cultivadas em frascos de soro de 100 ml contendo 50 ml do meio com 10 g/litro do glicerol respectivo e uma atmosfera de CO_2 com sobrepressão de 0,8 bar. A inoculação foi realizada com 2,0 ml do inóculo livre de glicose. As frascos foram incubadas por 9 horas em 37 °C, e 170 rpm (diâmetro de agitação: 2,5 cm).

O consumo da respectiva fonte-C (glicose em cultura de semente, glicerol em cultura principal) e produção do SA e subprodutos foram medidos por HPLC como descrito no Exemplo 5

3. Resultados

Na Tabela 13 a seguir, os resultados são resumidos.

Tabela 13 formação do SA e dos subprodutos de diferentes gliceróis mediante dd1.

Tipo de glicerol	**C1**	**C2**	**C3**	**P1**
Produtor[a]	ecoMotion	Biopetrol	Glacon Chemie	Sigma-Aldrich
Pureza [%][b]	90	42	76	99
t_c [h][c]	9	9	9	9
Δc_{GI} [g/L][d]	-6,3	-6,9	-6,5	-5,4
Δc_{SA} [g/L][e]	+7,6	+8,4	+7,4	+6,2
Δc_{LA} [g/L][e]	0	+0,1	+0,1	+0,1
Δc_{FA} [g/L][e]	+0,3	+0,3	+0,3	+0,3
Δc_{AA} [g/L][e]	+0,3	+0,5	+0,3	+0,3
STY [g/(L h)][f]	0,8	0,9	0,8	0,7
Rendimento [g/g][f]	1,2	1,2	1,1	1,1

[a] ecoMotion GmbH, Stemberg, Alemanha

Biopetrol Schwarzheide GmbH, Schwarzheide, Alemanha,

Glacon Chemie, Merseburg, Alemanha,

Riedel de Haen (número do produto 15523-1L-R) da Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze, Alemanha.

[b] Análise do produtor.

[c] Tempo da cultura

[d] Consumo do glicerol

[e] Formação dos ácidos succínico, láctico, fórmico e acético.

[f] Rendimento de tempo-espaço e rendimento de ácido succínico.

A Tabela 13 mostra que, após 9 horas, a concentração de SA e, consequentemente, do STY obtido com os glicerói brutos C1 a C3 (7,4 a 8,4 SA/litro e 0,8 a 0,9 g de SA/[l h], é, em todos os casos, mais elevada do que os valores respectivos obtidos com o glicerol puro P1 (6,2 g de SA/litro e 0,7 g de SA[l h]). Os glicerói brutos têm, portanto, além do preço inferior, a vantagem de melhor produtividade. Os Rendimentos obtidos com os glicerói brutos C1 a C3 (1,1 a 1,2 g de SA/g de glicerol) são semelhantes ao respectivo valor obtido com o glicerol puro P1 (1,1 g de SA/g de glicerol).

Exemplo 8 Tolerância Do Dd1 À Amônia E À Glicose

Uma abordagem comum para a produção fermentativa do ácido succínico e/ou dos sais de amônio de ácido succínico da glicose, deve ser uma cultura de batelada alimentada controlada por NH_3 com um certo nível inicial de glicose. Esta configuração requer tolerância tanto ao NH_3/NH_4OH quanto à glicose da cepa. Para testar DD1 quanto a estas propriedades, as culturas de bateladas com NH_4OH como o agente de controle do pH e níveis de glicose variáveis foram realizadas.

1. Preparação do meio

A composição do meio de cultura é descrita na Tabela 14.

Tabela 14 Composição Do Meio Para As Culturas De Bateladas Controladas Pelo Ph Com Níveis Variáveis De Glicose

Composto	concentração [g/litro]	Concentração da solução de estoque [g/litro]
Glicose	Variável[a]	650
Extrato de levedura Bacto (Becton Dickinson)	5	-
Peptona Bacto (Becton Dickinson)	5	-
$(NH_4)_2 SO_4$	1	500
$CaCl_2*2H_2O$	0,2	20
$MgCl_2*6H_2O$	0,2	20
NaCl	1	100
K_2HPO_4	3	500
Cisteína L	0,24	120
$MgCO_3$ (Riedel-de Haen 13117)	2	-

[a] A concentração inicial da glicose na pré-cultura foi de 50 g/litro, e nos fermentadores foi de 25, 50 ou 75, respectivamente.

O extrato de levedura, a peptona e o $MgCO_3$ foram autoclavados juntos nos fermentadores e nas frascos de soro. A glicose, o sulfato de amônio e o K_2HPO_4 foram todos separadamente autoclavados. Os cloretos de Ca, Mg e Na foram autoclavados juntos. Após o resfriamento dos fermentadores e das frascos de soro, os componentes que faltavam foram adicionados como soluções de estoque estéreis. Quanto às pré-culturas, a

mesma composição do meio foi usada, porém o $MgCO_3$ foi ajustado a 30 g/litro.

2. Culturas e análises

As pré-culturas foram cultivadas anaerobicamente em frascos de soro de 100 ml com rolhas de borracha butílica à prova de gases (Ochs GmbH, Bovenden/Lenglem, Alemanha) contendo 50 ml de meio de pré-cultura em 37 °C em uma incubadora vibratória (velocidade de rotação: 160 rpm, diâmetro da vibração: 2,5 cm). A inoculação das pré-culturas foi realizada com 1 ml de um banco de células funcionando com DD1 na câmara anaeróbica (MAKS MG 500, meintrup-dws). Imediatamente após a inoculação, a atmosfera gasosa (80 % de N_2, 15 % de CO_2 e 5 % de H_2) foi substituída por CO_2 puro com uma sobrepressão de cerca de 0,8 bar. Após 16 a 18 horas de incubação, duas frascos foram combinadas na caixa anaeróbica e, em cada caso, 15 ml foram usados para inocular os fermentadores (Sixfors, Infors, Suíça) contendo 300 ml de meio de cultura que havia sido gaseificado durante a noite com CO_2 para garantir condições livres de oxigênio. A temperatura da cultura foi de 37 °C, o pH de 6,5 foi mantido com 25 % de NH_4OH. A corrente gasosa de CO_2 e a velocidade do agitador foram ajustadas a 0,1 litro/minuto e 500 rpm, respectivamente. O consumo da glicose e a produção do SA foram quantificados por HPLC como descrito no Exemplo 1.

3. Resultados

Os resultados são mostrados na Figura 5.

Nas bateladas controladas por NH_4OH as culturas com glicose até 40 g/litro de SA são formadas dentro de 48 horas. O DD1 tem, portanto, um forte potencial de síntese para o ácido succínico e/ou sais de amônio de ácido succínico, os quais são favoráveis para a conversão química a THF/BDO/GBL e pirrolidonas (WO-A-2006/066839).

O índice inicial de produção de SA nos testes com 75 g/litro de glicose é levemente menor do que nos testes com 50 e 25 g/litro. Entretanto,

entre 6 e 12 horas, não mais existe nenhuma de tais diferenças, indicando que a inibição do substrato não é um problema nos níveis da glicose de até 75 g/litro.

Exemplo 9 Efeito Da Temperatura Da Cultura E Do Ph Sobre A Formação Do SA Por Dd1

Nesta experiência, a temperatura e o pH da cultura foram variados nas culturas de bateladas controladas por NH_4OH com 75 g/litro de glicose.

1. Preparação do meio

Não obstante a concentração de glicose constante, a composição e a preparação do meio foram as mesmas do Exemplo 8 'tolerância do DD1 à amônia e à glicose'.

2. Culturas e análises

Além das diferentes temperaturas e valores do pH das culturas testadas, as condições experimentais das culturas e análises de HPLC foram idênticas àquelas do Exemplo 8 'tolerância do DD1 à amônia e à glicose'.

3. Resultados

Os resultados são apresentados na Figura 6. A Figura 6 mostra que os dois testes em 37 °C e pH de 6,5 são muito semelhantes em relação tanto ao consumo de glicose quanto à produção de SA, indicando uma baixa variabilidade. Com base nesta variabilidade, os testes que foram realizados em pH 6,5 mostram que, entre 34,5 e 39,5 °C, a temperatura de cultura não tem nenhum impacto sobre o desempenho do processo. Entretanto, os testes, em 37 °C, indicam que uma redução do pH em 0,5 unidade resulta em uma clara queda da produtividade do SA, e um aumento do pH em 0,5 unidade resulta em uma leve queda da produtividade do SA. Com base nestes resultados, outras culturas do DD1 seriam – se o controle do pH fosse possível – realizadas em pH 6,5.

Exemplo 10 Efeito Dos Ingredientes Dos Meios Complexos

Sobre O Cultivo Do Dd1

O enriquecimento e isolamento do DD1 foi realizado em um meio de cultivo contendo 5 g/litro de extrato de levedura e 5 g/litro de peptona. Portanto, as primeiras experiências com DD1 foram conduzidas em um meio com estes compostos. Tendo em vista que eles contribuem para o custo dos materiais brutos e introduzem impurezas adicionais, diferentes composições de meios foram testadas, nas quais o extrato de levedura e a peptona foram reduzidos e substituídos pelo licor de infusão de milho mais barato (Solulys L48L, Roquette), respectivamente. A composição inicial dos meios dos testes é indicada por números (representando a concentração, isto é, 2, 5, 15 ou 25 g/litro) e por letras (representando o composto complexo respectivo, isto é, o extrato de levedura, peptona ou licor de infusão de milho).

1. Preparação do meio

Além da modificação respectiva da concentração do extrato de levedura – e da peptona, a concentração e a composição e preparação do meio de licor de infusão de milho adicional foram as mesmas do Exemplo 8 ''tolerância do DD1 à amônia e à glicose'. A concentração de batelada da glicose foi de 50 g/litro em todos os testes.

2. Culturas e análises

As condições experimentais foram idênticas àquelas do Exemplo 8 'tolerância do DD1 à amônia e à glicose'. Todas as culturas foram realizadas em 37 °C, as culturas nos fermentadores foram mantidas em pH 6,5 com 25 % de NH_4OH. As análises de HPLC foram realizadas como descrito no Exemplo 8.

3. Resultados

Os resultados são mostrados na Figura 7. A comparação dos testes '5Y5P' e '5Y' mostra que a peptona pode ser omitida sem qualquer efeito negativo sobre a produção do SA. A substituição parcial do extrato de

levedura por CSL não resulta em produção de ácido succínico reduzida em qualquer destes (teste '5Y' vs. testes '2Y15C'). Entretanto, a substituição completa do extrato de levedura por CSL resulta em perdas moderadas da produtividade.

O espectro dos subprodutos dos testes '5Y5P' e '5Y' é mostrado na Figura 8. A Figura 8 mostra que a omissão da peptona no meio de cultivo resulta em concentrações substancialmente mais baixas dos ácidos fórmico e acético, ao passo que as concentrações do ácido láctico foram comparáveis em ambos os testes. Esta experiência indica potencial quanto ao melhoramento do meio mediante i) redução do custo do material bruto, ii) redução das impurezas introduzidas pelos compostos do meio, e iii) redução da formação de produtos colaterais durante a cultura.

Exemplo 11 Relação De Dd1 Para Oxigênio

Uma vez que a produção fermentativa do SA é um processo que depende das condições anaeróbicas, o cultivo do DD1 para a produção do SA tem de ser realizado na ausência de oxigênio. Entretanto, é muito importante saber se o DD1 tolera a presença de oxigênio, também. Se este for o caso, a cepa pode ser manipulada sob condições aeróbicas, o que torna o trabalho de laboratório muito mais fácil e mais rápido. Portanto, a cepa DD1 foi testada em experiências de frasco de agitação com glicose.

1. Preparação do meio

A composição e a preparação do meio foram as mesmas descritas na Tabela 8.

2. Culturas e análises

As culturas de sementes anaeróbicas foram desenvolvidas em frascos de soro de 100 ml com rolhas de borracha butílica à prova de gás (ver acima) contendo 50 ml de meio com 50 g/litro de glicose e 30 g/litro de $MgCO_3$ e uma atmosfera de CO_2 com uma sobrepressão de 0,8 bar em 37 °C e 160 rpm (diâmetro de agitação: 2,5 cm) por 16 horas. A inoculação foi

realizada com 1 ml do WCB (Exemplo 2). 7,5 ml destas pré-culturas foram usadas para inocular as culturas aeróbicas principais.

As culturas aeróbicas principais (150 ml de meio com 60 g/litro de glicose e 80 g/litro de $MgCO_3$) foram desenvolvidas em 37 °C e 200 rpm (diâmetro de agitação: 2,5 cm) em frascos de Erlenmeyer de 500 ml com dois abafadores e plugues de algodão. O consumo do substrato e a formação do produto foram medidos por HPLC como descrito no Exemplo 1.

3. Resultados

Os resultados são apresentados na Figura 9. Os resultados mostram claramente o consumo de glicose aeróbica pela cepa DD1. Os produtos principais são os ácidos acético e láctico, que são os produtos dominantes das células aerobicamente desenvolvidas de "*Mannheimia succiniciproducens*" MBEL 55E, também (Lee *et al.*, 2002a). Os níveis iniciais do SA são introduzidos pela pré-cultura anaeróbica e são amplamente consumidos após 15 horas de cultura. Os dados claramente mostram que o DD1 é tolerante ao oxigênio.

Exemplo 12 Teste Do Dd1 Sob As Condições Descritas Por Kaist

O relacionamento mais íntimo do DD1 é a "*Mannheimia succiniciproducens*" MBEL 55E, uma cepa isolada por KAIST (ver acima). Para comparar DD1 com a referida cepa, a experiência de cultura descrita por KAIST (Figura 2b em Lee *et al.*, 2002a e Figura 3 em Lee *et al.*, 2002b) foi realizada com DD1.

1. Preparação do meio

A composição do meio de cultura foi idêntica à respectiva experiência de Lee *et al.*, 2002b, e é descrita na Tabela 15 a seguir.

Tabela 15 composição do meio para culturas de bateladas de dd1 sob as condições descritas por lee *et al.*, 2002b.

Composto	Concentração [g/L]	Concentração da solução de estoque [g/L]
Glicose	20	650
Extrato de levedura Bacto (Becton Dickinson)	5	-
Polipeptona peptona (Becton Dickinson)	5	-
$(NH_4)_2 SO_4$	1	500
$CaCl_2*2H_2O$	0,2	20
$MgCl_2*6H_2O$	0,2	20
NaCl	1	100
K_2HPO_4	3	500
$MgCO_3$ (Riedel-de Haen 13117)	10	-

O extrato de levedura, a peptona e $MgCO_3$ foram autoclavados conjuntamente nos fermentadores e frascos de soro. A glicose, o sulfato de amônio e o fosfato de potássio foram todos separadamente autoclavados. Os cloretos de Ca, Mg e Na foram autoclavados juntos. Após o resfriamento dos fermentadores e das frascos de soro, os componentes ausentes foram adicionados como soluções de estoque estéreis. Para as culturas de sementes, o mesmo meio foi usado.

2. Culturas e análises

A cultura de sementes foi desenvolvida anaerobicamente em uma frasco de soro de 100 ml com rolha de borracha butílica à prova de gás contendo 50 ml de meio em 39 °C em uma incubadora de agitação (velocidade de rotação: 160 rpm, diâmetro de agitação: 2,5 cm). A inoculação da cultura de sementes foi realizada com 1 ml do WCB (Exemplo 2) na câmara anaeróbica (MAKS MG 500, meintrup-dws). Imediatamente após a inoculação, a atmosfera gasosa (80 % de N_2, 15 % de CO_2 e 5 % de H_2) foi substituída por CO_2 puro com uma sobrepressão de cerca de 0,8 bar. Após 9 horas de incubação, o fermentador foi inoculado com 30 ml para iniciar a cultura no fermentador (Sixfors, Infors Suíça) contendo 300 ml de meio de cultura que havia sido gaseificado durante a noite com CO_2 para garantir

condições isentas de oxigênio. A temperatura de cultura foi mantida em 39 °C e o pH em 6,5, com NaOH 5 M. A corrente gasosa de CO_2 foi ajustada em 0,25 vvm. A velocidade do agitador foi ajustada em 500 rpm.

O consumo de glicose e a formação de SA e do subproduto foram medidos por HPLC como descrito no Exemplo 1.

3. Resultados

Os resultados são resumidos na Figura 10. Dentro de 5 horas de incubação, 18,9 g/litro de glicose são consumidos e 12,3 g/litro de ácido succínico, 4,5 g/litro de ácido acético e 3,3 g/litro de ácido fórmico são produzidos por DD1, indicando um espectro do produto que é semelhante àquele do MBEL55E. Entretanto, o rendimento do tempo-espaço obtido com DD1 quanto ao ácido succínico é de 2,5 g/(l h), o qual é claramente mais elevado do que aquele da cepa MBEL55E (1,8 g/[l h], Lee *et al.*, 2002b). O Rendimento é de 0,7 g de ácido succínico/g de glicose, o que é semelhante àquele da cepa MBEL55E.

Exemplo 13 Desenvolvimento Do Dd1 No Meio Sintético

É favorável usar um meio sintético sem ingredientes complexos para a fermentação do DD1 de modo a melhorar o processamento de jusante e planejar um meio sintético pobre para fermentação eficiente quanto ao custo. Portanto, um meio sintético foi planejado para DD1. Entrementes, um meio sintético foi também publicado para a *Mannheimia succiniciproducens* concernente próxima (Song *et al.*, 2008). Compostos essenciais e estimuladores haviam estabelecido o desenvolvimento do DD1. Comparando-se os resultados com *Mannheimia succiniciproducens*, diferenças óbvias foram observadas, sugerindo um meio de desenvolvimento mais econômico adequado para a cepa DD1.

1. Preparação do meio

O meio sintético de desenvolvimento para o DD1 foi desenvolvido em relação a outros meios de crescimento sintéticos para as

bactérias do rúmen (Nili e Brooker, 1995, McKinlay *et al.*, 2005), a experiência interna anterior com outras bactérias, e pela realização de experiências únicas de omissão.

Finalmente, o meio continha 50 g/litro de glicose, 1 g/litro de $(NH_4)_2SO_4$, 0,2 g/litro de $CaCl_2*2H_2O$, 0,2 g/litro de $MgCl_2*6H_2O$, 1 g/litro de NaCl, 3 g/litro de K_2HPO_4, 1 mg/litro de ácido nicotínico, 1,5 mg/litro de ácido pantotênico, 5 mg/litro de piridoxina, 5 mg/litro de riboflavina, 5 mg/litro de biotina, 1,5 mg/litro de HCl de tiamina, 0,26 g/litro de lisina, 0,15 g/litro de treonina, 0,05 g/litro de metionina, 0,71 g/litro de ácido glutâmico, 0,06 g/litro de histidina, 0,07 g/litro de triptofano, 0,13 g/litro de fenilalanina, 0,06 g/litro de tirosina, 0,5 g/litro de serina, 0,5 g/litro de glicina, 0,5 g/litro de cisteína, 0,1 g/litro de β-Alanina, 0,27 g/litro de alanina, 0,19 g/litro de valina, 0,23 g/litro de leucina, 0,16 g/litro de isoleucina, 0,33 g/litro de ácido aspártico, 0,1 g/litro de asparagina, 0,13 g/litro de prolina, 0,15 g/litro de arginina e 0,1 g/litro de glutamina.

As frascos de soro contendo 50 ml de meio complexo ou sintético foram autoclavadas com água e 30 g/litro de $MgCO_3$ como o sistema tampão. Glicose, sulfato de amônio e fosfato de potássio foram esterilizados separadamente. Os cloretos de Ca, Mg e Na foram esterilizados conjuntamente. Vitaminas e aminoácidos foram reunidos em várias soluções de estoque e esterilizados por filtragem. Após o esfriamento das frascos de soro, os componentes foram adicionados como soluções de estoque estéreis.

Meio complexo padrão foi preparado como descrito no Exemplo 12, sem o uso da polipeptona e iniciando-se com 50 g/litro de glicose e 30 g/litro de $MgCO_3$. Quanto às experiências das culturas de sementes e algum controle de cultura principal, o meio complexo foi usado.

2. Culturas e análises

A cultura de sementes foi desenvolvida em meio complexo anaerobicamente com o uso de uma frasco de soro de 100 ml com rolha de

borracha butílica à prova de gás contendo 50 ml do meio em 37 °C em uma incubadora vibratória (velocidade de rotação: 170 rpm, diâmetro da agitação: 2,5 cm). A inoculação da primeira cultura de sementes foi realizada aerobicamente com 1 ml do WCB (Exemplo 2) sob condições estéreis. Imediatamente após a inoculação, a atmosfera de gás aeróbico foi substituída por CO_2 puro com uma sobrepressão de cerca de 0,8 bar. Após 8 horas de incubação, 2 ml da primeira cultura de sementes foram centrifugados e lavados por três vezes com o uso de uma solução de lavagem estéril contendo 2 g/litro de $(NH_4)_2SO_4$, 0,4 g/litro de $CaCl_2*2H_2O$, 0,4 g/litro de $MgCl_2*6H_2O$, 2 g/litro de NaCl e 6 g/litro de K_2HPO_4 antes da inoculação na frasco de soro de 100 ml da segunda cultura de sementes.

A incubação da segunda cultura de sementes ocorreu por 20 horas como descrito quanto à primeira cultura de sementes, antes do uso de 2 ml da segunda cultura novamente de modo a inocular a cultura principal a qual havia sido incubada por outras 20 horas. De modo a determinar-se compostos essenciais ou estimuladores, a vitamina ou o aminoácido de interesse foi omitido na segunda cultura de semente e na cultura principal. O consumo de glicose e a formação de ácido succínico foram medidos por HPLC como descrito no Exemplo 1.

3. Resultados

Os resultados são resumidos na Tabela 16. Foi observado que o meio que exclui a biotina e o HCl de tiamina não sustêm o crescimento e a produção do ácido succínico. A biotina e o HCl de tiamina foram, apresentaram-se, portanto, como sendo compostos essenciais para o desenvolvimento do DD1. As concentrações da biotina menores do que 0,6 mg/litro foram suficientes para o desenvolvimento do DD1. A cisteína de aminoácido foi observada ser não essencial para a expansão do DD1, como a omissão da cisteína leva à produção semelhante do ácido succínico como o controle contendo cisteína.

Ao contrário destes resultados, a biotina foi descrita como não essencial porém estimuladora, e a cisteína como essencial para o desenvolvimento da *Mannheimia succiniciproducens* (Song *et al.*, 2008). O HCl de tiamina é essencial para ambos os organismos. Uma cepa prototrófica para a cisteína é esperada ter um meio de produção mais pobre e mais barato para a produção do ácido succínico.

Tabela 16 Consumo De Glicose E Produção De Ácido Succínico Por Dd1 Desenvolvido Em Meio Sintético

Condições de desenvolvimento	Consumo de glicose (g/litro)	Produção de ácido succínico (g/litro)
Meio sintético completo	49,93	30,35
Meio sintético sem biotina	0,8	0,08
Meio sintético sem HCl de tiamina	6,27	0,81
Meio sintético sem cisteína	48,88	30,01

Exemplo 14 Metabolização Do Glicerol Pela Cepa Dd1

A produtividade da cepa DD1 na presença de glicerol como uma fonte de carbono foi ainda analisada utilizando-se os seguintes meio otimizado e condições de incubação:

1. Preparação do meio e cultura

O DD1 foi desenvolvido da seguinte forma: As células de uma solução de estoque congelada foram estriadas sobre uma placa de Ágar BHI (Becton Dickinson). As células foram raspadas e colocadas em suspensão em meio BHI fresco e incubadas em uma frasco de soro anaeróbico em 37 °C por 5,5 horas. As células foram inoculadas no meio contendo os compostos descritos na Tabela 17 com o uso de frascos de soro de 100 ml. A OD de partida em 600 nm foi de 0,1 (determinada em uma via de 1 ml). Os componentes do meio 1 a 7 foram autoclavados juntos, o composto 8 foi autoclavado na frasco de soro, os compostos 9 e 10 foram autoclavados separadamente e adicionados ao meio final. As frascos de soro foram purgadas pelo menos três vezes com CO_2 através de rolhas de borracha butílica e deixadas com uma sobrepressão de CO_2 de 0,8 bar. As frascos de soro foram incubadas em 200 rpm e 37 °C. Após 24 horas, as frascos de soro

foram abertas e os metabólitos foram determinados por HPLC como descrito no Exemplo 1.

Tabela 17 Composição Do Meio

	Composto	Concentração (g/litro)
1	Extrato de levedura Bacto (Becton Dickinson)	5
2	Peptona polipeptona (Becton Dickinson)	10
3	$(NH_4)_2 SO_4$	2
4	$CaCl_2*2H_2O$	0.2
5	$MgCl_2*6H_2O$	0.2
6	NaCl	2
7	K_2HPO_4	3
8	$MgCO_3$ (Riedel-de Haen 13117)	50
9	$NaHCO_3$	25
10	Glicerol	70

Tabela 18 Resultados Do Exemplo 14

Metabolização do glicerol	
t_c [h][c]	24
Δc_{GI} [g/L][d]	-28,4
Δc_{SA} [g/L][e]	+35,3
Δc_{LA} [g/L][e]	0
Δc_{FA} [g/L][e]	+2,4
Δc_{AA} [g/L][e]	+2,5
STY [g/(L h)][f]	1,47
Rendimento [g/g][f]	1,24
Relação de SA/FA[g]	14,7
Relação de SA/AA[g]	14,1

[c] tempo de cultivo

[d] consumo de glicerol

[e] formação de ácido succínico, láctico, fórmico e acético.

[f] rendimento de tempo-espaço e rendimento quanto ao ácido succínico.

[g] relação g/l de ácido succínico por g dos produtos colaterais ácido fórmico (FA e ácido acético (AA).

2. Resultados:

Os seguintes resultados foram obtidos como descrito na Tabela 18. O DD1 produziu 35,3 g/litro de ácido succínico de 28,4 g/litro de glicerol

em 24 horas, levando a um rendimento de tempo-espaço de 1,47 g/litro de ácido succínico por hora, o que é superior a outros exemplos documentados de metabolização de glicerol (Lee *et al.*, 2001). O rendimento de 1,4 g/g ficou perto do rendimento teórico descrito de 1,29 g de ácido succínico por grama de glicerol, se a modificação do glicerol 1M e do CO_2 1M em ácido succínico 1M fosse obtida (Song e Lee, 2006).

Exemplo 15 Produção De Succinato De Glicerol E Maltose

A produtividade do DD1 na presença de duas fontes de carbono foi determinada. O DD1 foi cultivado na presença do dissacarídeo maltose e do glicerol, simultaneamente.

1. Preparação do meio e cultivo

Células de uma solução de estoque congelada foram estriadas sobre uma placa de Ágar BHI (Becton Dickinson). As células foram raspadas e colocadas em suspensão em meio BHI fresco e incubadas em uma frasco de soro anaeróbico em 37 °C por 5,5 horas. O meio é descrito na Tabela 19. Frascos de soro de 200 ml foram usadas. As células foram inoculadas com uma OD de partida de 0,1 (determinada em um curso de 1 ml com um fotômetro de farmácia em 600 nm). As frascos de soro foram purgadas pelo menos três vezes com CO_2 através das rolhas de borracha butílica e deixadas com uma sobrepressão de CO_2 de 0,8 bar. As frascos de soro foram incubadas em 200 rpm e 37 °C.

Tabela 19 Preparação Do Meio Para O Exemplo 15

Composto	Concentração (g/litro)
Maltose * H_2O	22
Glicerol	56,82
Extrato de levedura Bacto	10
$(NH_4)_2SO_4$	2
$CaCl_2*2H_2O$	0,2
$MgCl_2*6H_2O$	0,2
NaCl	2
K_2HPO_4	3
$NaHCO_3$	8,4
MgCO3	50
Polipropileno glicol 1200 antiespuma	0,1

A cultura de sementes foi inoculada com uma cultura congelada de 2 ml anaerobicamente desenvolvida em uma frasco de soro de 200 ml com rolha de borracha butílica à prova de gases, contendo 50 ml de meio em 37 °C em uma incubadora de agitação (160 rpm, diâmetro de agitação: 2,5 cm). A frasco foi purgada com CO_2 puro com uma sobrepressão de cerca de 0,8 bar. Após 8 horas de incubação, o fermentador foi inoculado com 50 ml para iniciar a cultura no fermentador contendo 1 litro de meio de cultura que havia sido gaseificado com CO_2 para garantir as condições livres de oxigênio. A temperatura de cultivo foi mantida em 37 °C e o pH em 6,5 sem adição de bases, exceto o tampão $MgCO_3$ no meio. A corrente gasosa de CO_2 foi ajustada em 0,2 vvm. A velocidade do agitador foi ajustada em 300 rpm. O consumo da maltose e da glicose, e a formação de SA e de subprodutos foram medidos por HPLC conforme descrito no Exemplo 1. As células foram cultivadas em 37 °C e a biomassa foi determinada tomando-se uma amostra e dissolvendo-se o $MgCO_3$ residual pela adição de HCl 1M. Após a dissolução do $MgCO_3$, as células foram lavadas com água e secadas por liofilização. A biomassa seca foi determinada por pesagem.

Resultados:

Os resultados são resumidos na Tabela 20. Dentro das 16 horas de incubação, 36,5 g/litro de glicerol e 11,2 g/litro de maltose são

consumidos, e 57,54 g/litro de ácido succínico, 3,41 g/litro de ácido acético e 3,7 g/litro de ácido fórmico, são formados por DD1. O rendimento de tempo-espaço obtido com DD1 para o ácido succínico é de 3,4 g/(l h), o que é claramente mais elevado do que anteriormente relatado quanto à cepa MBEL55E e *Anaerobiospirillum succiniciproducens* e é superior às outras cepas descritas na literatura (Lee *et al.*, 2002b, Lee *et al.*, 2001, Song e Lee, 2006).

O rendimento do ácido succínico foi determinado como 1,2 g de ácido succínico por grama de fonte de carbono para a soma de glicerol e maltose. Este rendimento é também superior às cepas descritas na literatura (Lee *et al.*, 2002b, Lee *et al.*, 2001, Song e Lee, 2006).

O rendimento de tempo-espaço de 3,7 g/(l h) de ácido succínico é superior às cepas descritas na literatura (Song *et al.*, 2006).

Além disso, a produtividade específica quanto ao ácido succínico de 0,77 [g $gDCW^{-1}$ h^{-1}][h] foi observada ser superior às cepas descritas na literatura (Song *et al.*, 2006).

Tabela 20 Resultados Do Exemplo 15

Glicerol e maltose como fontes de carbono	
t_c [h][b]	16
Biomassa BTM [g/litro]	4,7
$\Delta C_{Glicerol}$ [g/litro][d]	-36,5
$\Delta C_{Succínico}$ ácido [g/litro][e]	57,54
$\Delta C_{Maltose}$ [g/litro][d]	-11,2
ΔC_{FA} [g/litro][e]	3,7
ΔC_{AA} [g/litro][e]	3,41
STY [g/(l h)][f]	3,4
Rendimento de succinato [g/g][g]	1,2
Produtividade específica para SA [g $gDCW^{-1}$ h^{-1}][h]	0,77

[b] Tempo de cultivo

[c] biomassa seca como determinado pela solubilização de $MgSO_3$

[d] consumo de glicerol ou maltose

[e] formação dos ácidos succínico, fórmico e acético

[f] rendimento de tempo-espaço por g de ácido succínico por [l *h]

[g] rendimento g de ácido succínico por g de substrato (soma de maltose e glicerol)

[h] Produtividade específica g de ácido succínico por g de biomassa (peso de célula seca) por h.

Sumário Das Experiências

1. A cepa DD1 da presente invenção tem aspectos muito promissores:

- Parâmetros de produtividade atrativos sobre o glicerol (título de SA: até 57 g/litro, rendimento de tempo-espaço de 3,4 g/(l h) de ácido succínico, uma produtividade específica para o ácido succínico de 0,77 g/(g DCW h) e uma produção de carbono de até 1,24 g/g de carbono consumido.

- Níveis de glicose e de glicerol de pelo menos 75 g/litro e 70 g/litro, respectivamente, são tolerados.

- D-glicose, D-xilose, L-arabinose, D-galactose, D-manose são eficientemente convertidos em SA, indicando adequabilidade para a produção de SA com um Glicerol de abordagem de biorrefinaria.

- O glicerol, especialmente o material não purificado de usinas de biodiesel, é também eficientemente usado para a produção de SA; Os rendimentos das produtividades específicas dos rendimentos de tempo-espaço e as relações de produto/subproduto são substancialmente mais elevadas e melhores do que com a D-glicose e outros açúcares.

- NH_3/NH_4OH para o controle do pH é tolerado, a produção do ácido succínico e/ou dos sais de amônio de ácido succínico sendo, portanto, possível.

- D-glicose, D-xilose, L-arabinose, D-galactose, D-manose são eficientemente convertidas em SA, indicando adequabilidade para a produção do SA com uma abordagem de biorrefinaria.

- O glicerol, especialmente o material não purificado das

usinas de biodiesel, é também eficazmente usado para a produção do SA; Os rendimentos e as relações de produto/subproduto são substancialmente mais elevados do que com a D-glicose e outros açúcares.

- A combinação das fontes de carbono separadas é eficazmente convertida em ácido succínico.

- O crescimento aeróbico das células é possível, o que é uma clara vantagem para a manipulação geral da cepa no laboratório, especialmente para o desenvolvimento adicional da cepa.

- O meio de cultura foi substancialmente melhorado sem perdas de produtividade.

Conclusões:

1. A cepa tem um excelente potencial para a produção do ácido succínico e/ou dos sais de ácido succínico, por exemplo sais de amônio,os quais podem ser convertidos em THF/BDO/GBL e pirrolidonas.

2. A produção do ácido succínico para aplicações monoméricas é outra opção atrativa.

REFERÊNCIAS

Dharmadi, Y., Murarka, A., Gonzalez, R. (2006) *Anaerobic fermentation of glycerol by Escherichia coli: A new platform for metabolic engineering. Biotech Bioeng* 94: 821-829.

Janssen, P. H. (1991) *Characterization of a succincate-fermenting anaerobic bacterium isolated from a glycolate-degrading mixed culture. Arch Microbiol.* 155: 288-293.

Jukes, T.H., Cantor, C. R. (1969) *Evolution of protein molecules*. Em: *Mammalian Protein Metabolism*, volume 3, pp 21-132. Editado por Munro, H. N. New York: Academic Press

Kamm, B., Kamm, M., Schmidt, M., Hirth, T., Schulze, M. (2006) *Lignocellulose-based chemical products and product family trees*. Em: Kamm, B., Gruber, P. R., Kamm, M. (editores) *Biorefineries - Industrial*

Processes and products. Status Quo and future directions. Volume 2. Wiiey-VCH, Weinheim.

Lee, J. (1997) *Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. J Biotech* 56: 1-24.

Lee, P. C., Lee, S. Y., Hong, S. A., Chang, H. N. (2002a) *Isolation and characterization of a new Succinic acid-producing bacterium, Mannheimia succiniciproducens MBEL 55E, from bovine rumen. Appl Microbiol Biotechnol* 58: 663-668.

Lee, P. C., Lee, W. G., Lee, S. Y., Chang, H. N. (2001) *Succinic acid production with reduced byproduct formation in the fermentation of Anaerobiospirillum succiniciproducens using glycerol as a carbon source. Biotech Bioeng* 72: 41-48.

Lee, S. Y., Chang, H. N., Lee, P. C., Lee, W. G. (2002b) *Organic acid producing microorganism and process for preparing organic acids employing the same*. WO 02/00846 A1.

Maidak, B. L., Cole, J. R., Parker Jr., T. C., Garrity, G. M., Larsen, N., Li, B., Lilburn, T. G., McCaughey, M. J., Olsen, G. J., Overbeek, R., Pramanik, S., Schmidt, T. M., Tiedje, J. M., Woese, C. R. (1999) *A new version of the RDP (Ribosomal Database Project). Nucl Acids Res* 27: 171-173.

McKinlay, J., Zeikus, J., Vieille, C. (2005) *Insights into Actinobacillus succinogenes fermentative metabolism in a chemically defined growth medium. Appl Environ Microbiol* 71: 6651-6656.

Nili, N., Brooker, J. (1995) *A defined medium for rumen bacteria and identification of strains impaired in de-novo biosynthesis of certain amino-acids. Lett Appl Microbiol* 21: 69-74.

Peters-Wendisch, P. G. *et al. ARCHIVES OF MICROBIOLOGY* 165 387-396 1996.

Rainey, F. A., Ward-Rainey, N., Kroppenstedt, R. M.,

Stackebrandt, E. (1996) *The genus Nocardiopsis represents a phylogenetically coherent taxon and a distict actinomycete lineage: proposal of Nocardiopsaceae fam. nov. Int J Syst Bacteriol* 46: 1088-1092.

Saitou, N., Nei, M. (1987) *The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol Evol* 4: 406-425.

Song, H. e Lee, S. (2006) *Production of succinic acid by bacterial fermentation. Enz Microb Tech* 39: 352-361.

Song, H., Kim, T., Choi, B., Choi, S., Nielsen, L., Chang, H., Lee, S. (2008) *Development of chemically defined medium for Mannheimia succiniciproducens based on its genome sequence. Appl Microbiol Biotechnol* 79: 263-272.

Yazdani, S., Gonzalez, R. (2007) *Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. Curr Opinion Biotechnol* 18: 213-219.

No contexto da presente invenção uma cepa bacteriana DD1 foi depositada com DSMZ em 11 de agosto de 2006, tendo o número de depósito DSM 18541.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para a produção fermentativa de um composto sendo ácido succínico ou um seu sal ou derivado, o processo caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

a) incubar a cepa bacteriana DD1, depositada com a DSMZ e tendo o número de depósito DSM 18541, em um meio contendo glicerol como uma fonte de carbono assimilável e cultivar referida cepa sob condições que favoreçam a formação do ácido orgânico desejado; e

b) obter o referido ácido succínico ou seu sal ou derivado do meio.

2. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que dita cepa apresenta pelo menos uma das seguintes características metabólicas adicionais:

a) produção do ácido succínico da sacarose;

b) produção do ácido succínico da maltose;

c) produção do ácido succínico da D-frutose;

d) produção do ácido succínico da D-galactose;

e) produção do ácido succínico da D-manose;

f) produção do ácido succínico da D-glicose;

g) produção do ácido succínico da D-xilose;

h) produção do ácido succínico da L-arabinose;

i) nenhuma utilização de xilitol, inositol e sorbitol;

j) crescimento sob condições tanto aeróbicas quanto anaeróbicas;

k) crescimento nas concentrações iniciais da glicose de 75 g/litro ou mais;

l) crescimento nas concentrações iniciais do glicerol de 70 g/litro ou mais;

m) tolerância à amônia.

3. Processo de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que dita cepa converte a sacarose, maltose, D-frutose, D-glicose, D-xilose, L-arabinose, D-galactose, D-manose e/ou glicerol em ácido succínico com um coeficiente de rendimento YP/S de pelo menos 0,5 g/g.

4. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que dita cepa apresenta pelo menos uma das características seguintes:

a) conversão de pelo menos 28 g/litro de glicerol em pelo menos 28,1 g/litro de ácido succínico, com um coeficiente de rendimento YP/S de pelo menos 1,0 g/g;

b) conversão de pelo menos uma fonte de carbono selecionada de sacarose, maltose, D-frutose, D-glicose, D-xilose, L-arabinose, D-galactose, D-manose e/ou glicerol, em ácido succínico, com um rendimento de produtividade específica de pelo menos 0,6 g $gDCW^{-1}$ h^{-1} de ácido succínico;

c) conversão de pelo menos uma fonte de carbono selecionada de sacarose, maltose, D-frutose, D-glicose, D-xilose, L-arabinose, D-galactose, D-manose e/ou glicerol, em ácido succínico, com um rendimento de tempo-espaço quanto ao ácido succínico de pelo menos 2,2 g/(l h) de ácido succínico;

d) conversão de pelo menos 28 g/litro de pelo menos uma fonte de carbono selecionada de sacarose, maltose, D-frutose, D-glicose, D-xilose, L-arabinose, D-galactose, D-manose e/ou glicerol, em ácido succínico, com um rendimento de tempo-espaço quanto ao ácido succínico de pelo menos 2,2 g/(l h);

e) conversão de pelo menos uma fonte de carbono selecionada de sacarose, maltose, D-frutose, D-glicose, D-xilose, L-arabinose, D-galactose, D-manose e/ou glicerol, em ácido succínico, com um rendimento

de produtividade específica de pelo menos 0,6 g $gDCW^{-1}$ h^{-1} de ácido succínico e um rendimento de tempo-espaço quanto ao ácido succínico de pelo menos 2,2 g/(l h).

5. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que dita cepa bacteriana apresenta um rDNA 16S da SEQ ID NO: 1 ou um rDNA 23S da SEQ ID NO: 2.

6. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que a fermentação é realizada em uma temperatura na faixa de 10 a 60 °C, em um pH de 5,0 a 9,0, na presença de dióxido de carbono.

7. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a fonte de carbono é glicerol ou uma mistura de glicerol e pelo menos uma outra fonte de carbono selecionada dentre sacarose, maltose, D-frutose, D-galactose, D-manose, D-glicose, D-xilose e L-arabinose.

8. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de que a concentração da fonte de carbono assimilável é ajustada a um valor em uma faixa de 5 a 80 g/litro.

9. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, o processo caracterizado pelo fato de ser realizado de forma descontínua ou contínua.

10. Processo para a produção de um composto sendo ácido succínico e/ou sais de amônio de ácido succínico, o processo caracterizado pelo fato de que compreende a produção fermentativa do ácido succínico como definido em qualquer uma das reivindicações anteriores e o controle do pH com amônia ou uma sua solução aquosa, ou NH_4HCO_3, $(NH_4)_2CO_3$, NaOH, Na_2CO_3, $NaHCO_3$, KOH, $KHCO_3$, $Mg(OH)_2$, $MgCO_3$, $Mg(HCO_3)_2$, $Ca(OH)_2$, $CaCO_3$, $Ca(HCO_3)_2$, CaO, $CH_6N_2O_2$, C_2H_7N e misturas destes.

11. Processo para a produção de um composto sendo tetraidrofurano (THF) e/ou 1,4-butanodiol (BDO) e/ou gama-butirolactona

(GBL), o processo caracterizado pelo fato de que compreende:

a) a produção fermentativa de ácido succínico e/ou sais de ácido succínico, como definido na reivindicação 10, e

b1) ou a hidrogenação catalítica direta do ácido livre obtido em THF e/ou BDO e/ou GBL ou

b2) a esterificação química do ácido succínico livre obtido e/ou dos sais de ácido succínico, em seu éster de dialquila inferior correspondente e subsequente hidrogenação catalítica do referido éster em THF e/ou BDO e/ou GBL.

12. Processo para a produção de compostos sendo pirrolidonas, caracterizado pelo fato de que compreende:

a) a produção fermentativa dos sais de amônio de ácido succínico como definido na reivindicação 10, e

b) a conversão química dos sais de amônio de ácido succínico nas pirrolidonas, de uma maneira por si conhecida.

13. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 7 a 12, caracterizado pelo fato de que o referido glicerol, que é usado como fonte de carbono assimilável, é obtido por clivagem estérica de triacilglicerídeos.

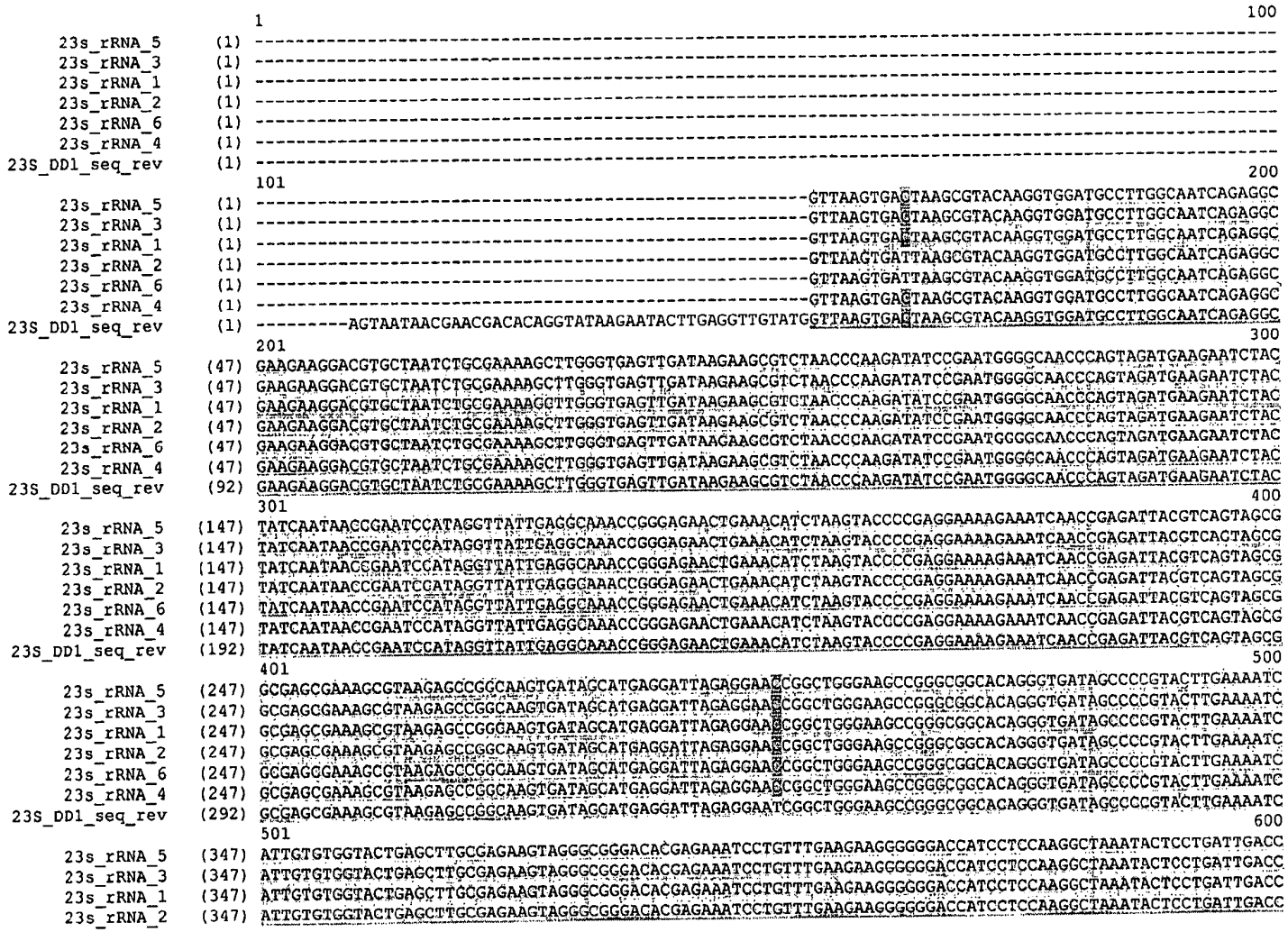
14. Processo de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que o glicerol é um produto residual obtido da fabricação do biodiesel.

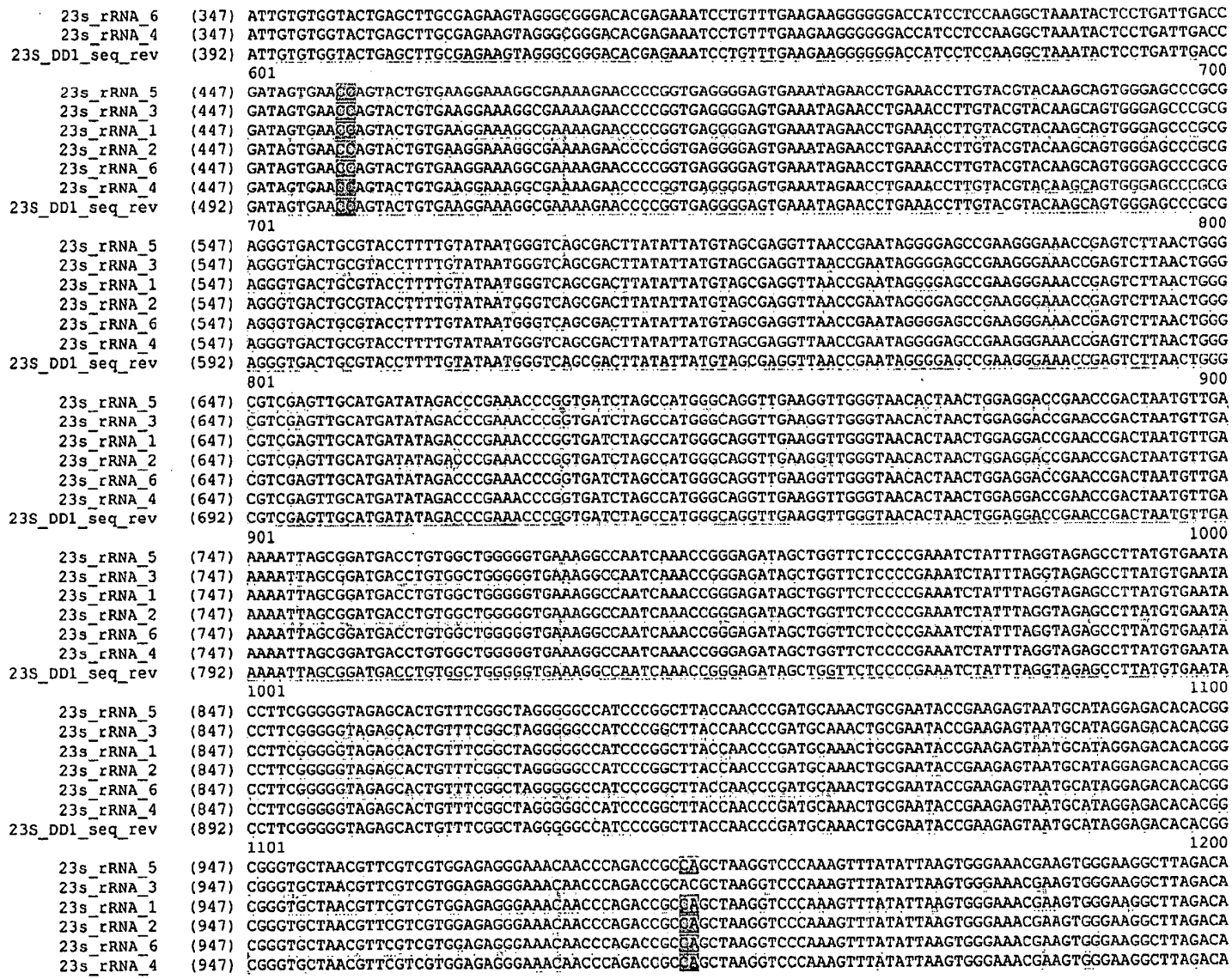
15. Uso de uma cepa bacteriana utilizada no processo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de ser na produção fermentativa de um produto químico fino orgânico.

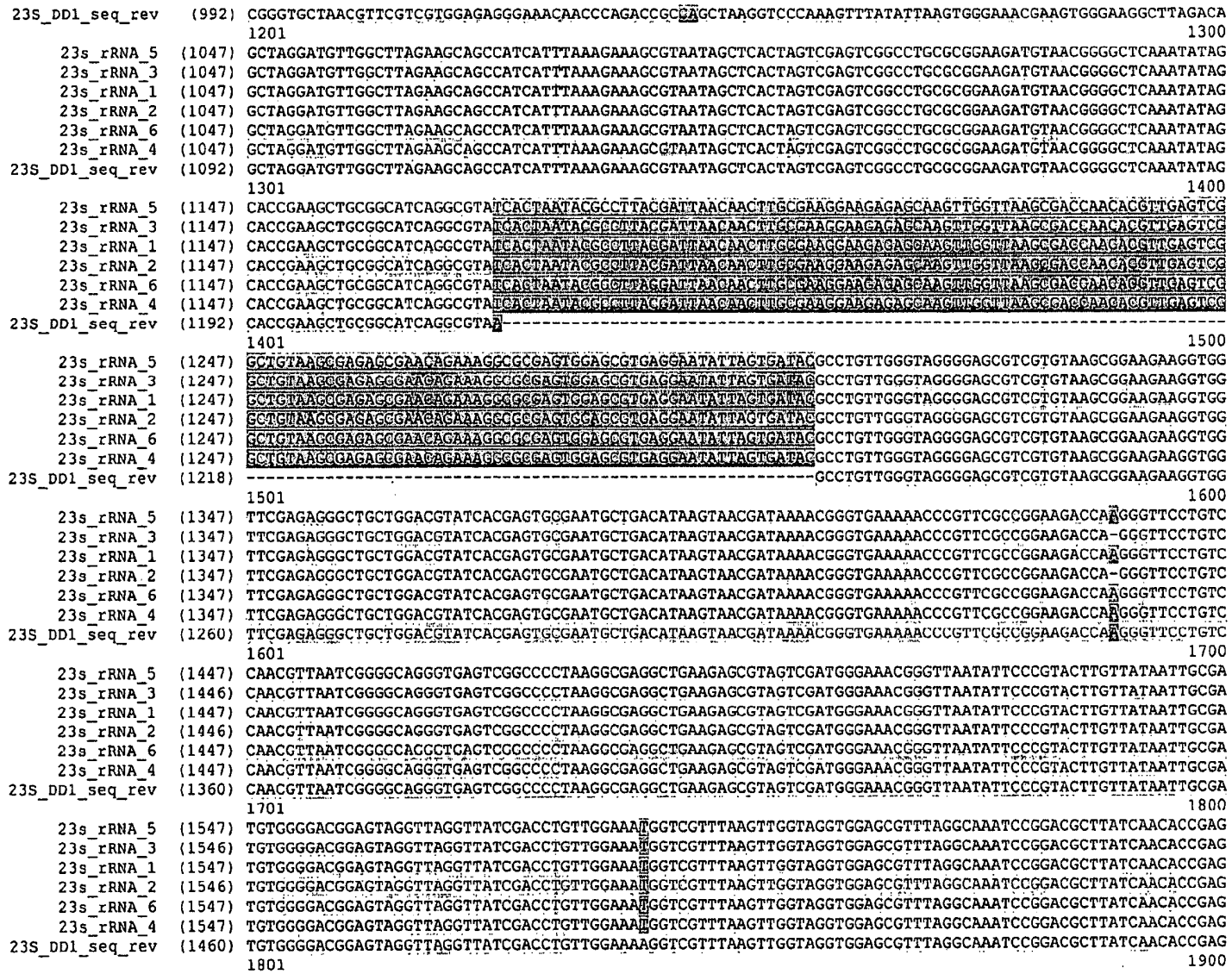
16. Uso de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que o produto químico fino orgânico é o ácido succínico ou um seu sal ou éster derivado do mesmo.

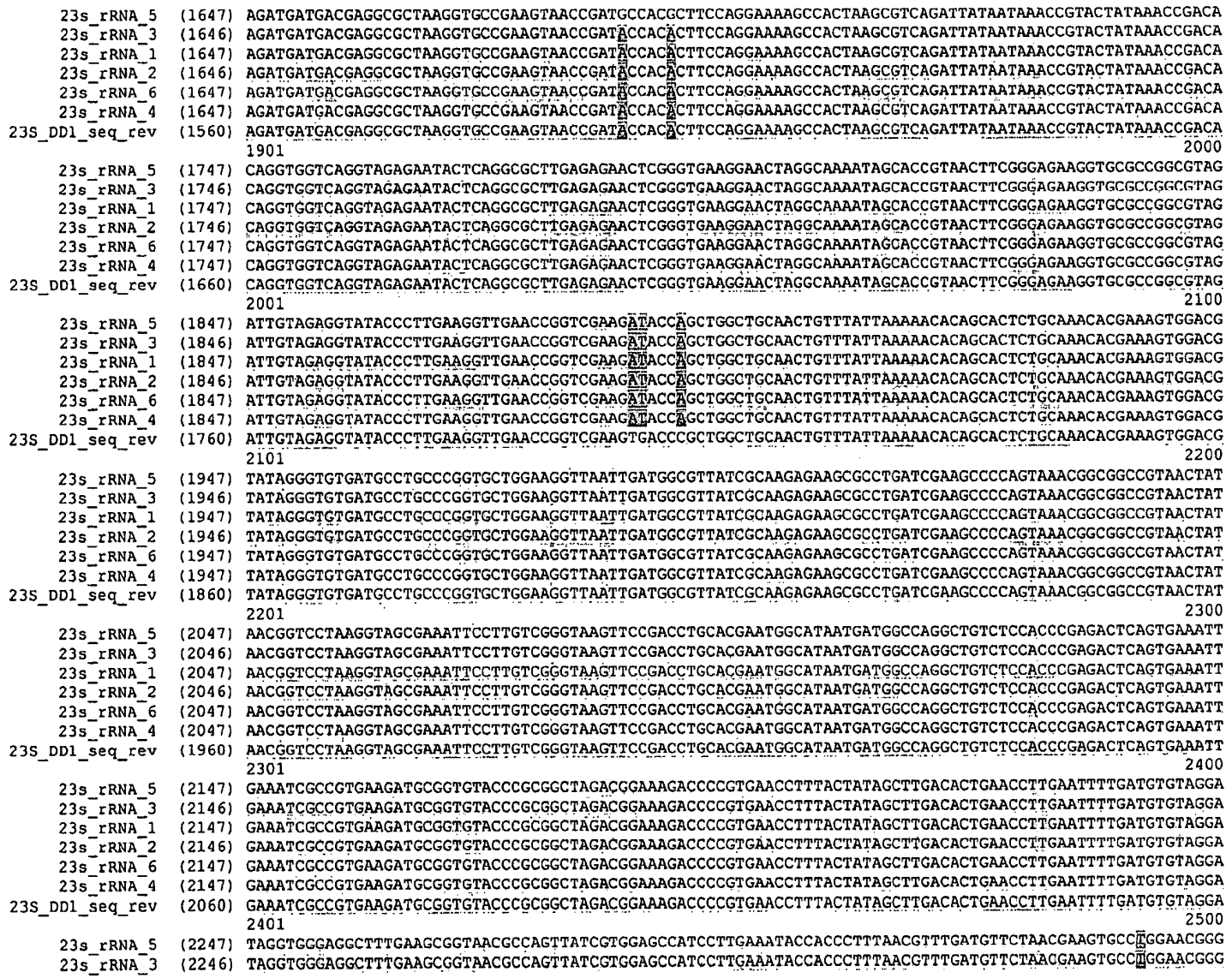
Anexo 1

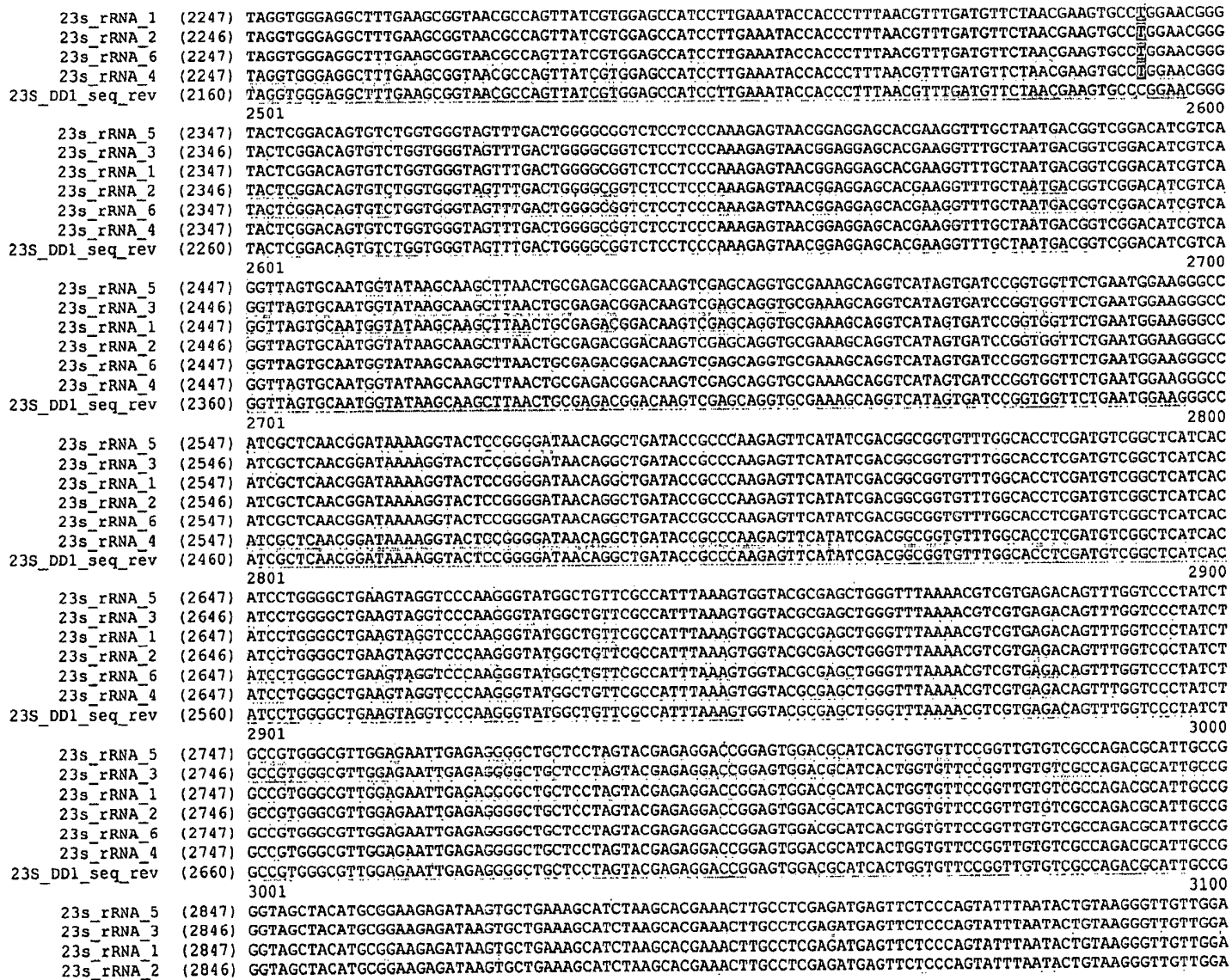
Alinhamento completo entre 23S rRNA 235 de M. succiniprocens MBEL 55 (235_rRNA_ 12-61) e BASF DD1

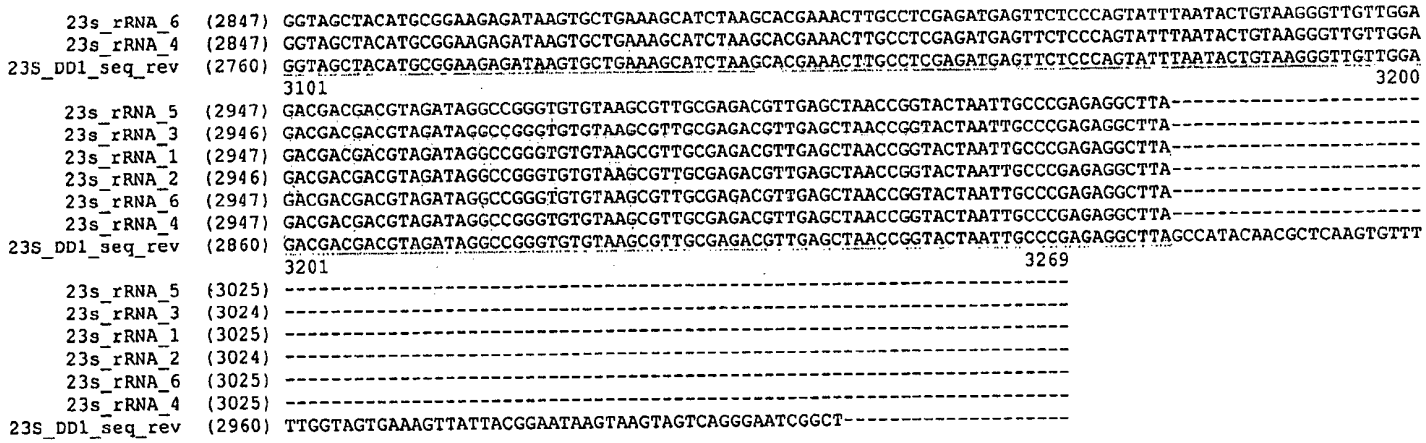



23s_rRNA_6 (347) ATTGTGTGGTACTGAGCTTGCGAGAAGTAGGGCGGGACACGAGAAATCCTGTTTGAAGAAGGGGGGACCATCCTCCAAGGCTAAATACTCCTGATTGACC
23s_rRNA_4 (347) ATTGTGTGGTACTGAGCTTGCGAGAAGTAGGGCGGGACACGAGAAATCCTGTTTGAAGAAGGGGGGACCATCCTCCAAGGCTAAATACTCCTGATTGACC
23S_DD1_seq_rev (392) ATTGTGTGGTACTGAGCTTGCGAGAAGTAGGGCGGGACACGAGAAATCCTGTTTGAAGAAGGGGGGACCATCCTCCAAGGCTAAATACTCCTGATTGACC
601 700
23s_rRNA_5 (447) GATAGTGAACGAGTACTGTGAAGGAAAGGCGAAAAGAACCCCGGTGAGGGGAGTGAAATAGAACCTGAAACCTTGTACGTACAAGCAGTGGGAGCCCGCG
23s_rRNA_3 (447) GATAGTGAACGAGTACTGTGAAGGAAAGGCGAAAAGAACCCCGGTGAGGGGAGTGAAATAGAACCTGAAACCTTGTACGTACAAGCAGTGGGAGCCCGCG
23s_rRNA_1 (447) GATAGTGAACGAGTACTGTGAAGGAAAGGCGAAAAGAACCCCGGTGAGGGGAGTGAAATAGAACCTGAAACCTTGTACGTACAAGCAGTGGGAGCCCGCG
23s_rRNA_2 (447) GATAGTGAACGAGTACTGTGAAGGAAAGGCGAAAAGAACCCCGGTGAGGGGAGTGAAATAGAACCTGAAACCTTGTACGTACAAGCAGTGGGAGCCCGCG
23s_rRNA_6 (447) GATAGTGAACGAGTACTGTGAAGGAAAGGCGAAAAGAACCCCGGTGAGGGGAGTGAAATAGAACCTGAAACCTTGTACGTACAAGCAGTGGGAGCCCGCG
23s_rRNA_4 (447) GATAGTGAACGAGTACTGTGAAGGAAAGGCGAAAAGAACCCCGGTGAGGGGAGTGAAATAGAACCTGAAACCTTGTACGTACAAGCAGTGGGAGCCCGCG
23S_DD1_seq_rev (492) GATAGTGAACGAGTACTGTGAAGGAAAGGCGAAAAGAACCCCGGTGAGGGGAGTGAAATAGAACCTGAAACCTTGTACGTACAAGCAGTGGGAGCCCGCG
701 800
23s_rRNA_5 (547) AGGGTGACTGCGTACCTTTTGTATAATGGGTCAGCGACTTATATTATGTAGCGAGGTTAACCGAATAGGGGAGCCGAAGGGAAACCGAGTCTTAACTGGG
23s_rRNA_3 (547) AGGGTGACTGCGTACCTTTTGTATAATGGGTCAGCGACTTATATTATGTAGCGAGGTTAACCGAATAGGGGAGCCGAAGGGAAACCGAGTCTTAACTGGG
23s_rRNA_1 (547) AGGGTGACTGCGTACCTTTTGTATAATGGGTCAGCGACTTATATTATGTAGCGAGGTTAACCGAATAGGGGAGCCGAAGGGAAACCGAGTCTTAACTGGG
23s_rRNA_2 (547) AGGGTGACTGCGTACCTTTTGTATAATGGGTCAGCGACTTATATTATGTAGCGAGGTTAACCGAATAGGGGAGCCGAAGGGAAACCGAGTCTTAACTGGG
23s_rRNA_6 (547) AGGGTGACTGCGTACCTTTTGTATAATGGGTCAGCGACTTATATTATGTAGCGAGGTTAACCGAATAGGGGAGCCGAAGGGAAACCGAGTCTTAACTGGG
23s_rRNA_4 (547) AGGGTGACTGCGTACCTTTTGTATAATGGGTCAGCGACTTATATTATGTAGCGAGGTTAACCGAATAGGGGAGCCGAAGGGAAACCGAGTCTTAACTGGG
23S_DD1_seq_rev (592) AGGGTGACTGCGTACCTTTTGTATAATGGGTCAGCGACTTATATTATGTAGCGAGGTTAACCGAATAGGGGAGCCGAAGGGAAACCGAGTCTTAACTGGG
801 900
23s_rRNA_5 (647) CGTCGAGTTGCATGATATAGACCCGAAACCCGGTGATCTAGCCATGGGCAGGTTGAAGGTTGGGTAACACTAACTGGAGGACCGAACCGACTAATGTTGA
23s_rRNA_3 (647) CGTCGAGTTGCATGATATAGACCCGAAACCCGGTGATCTAGCCATGGGCAGGTTGAAGGTTGGGTAACACTAACTGGAGGACCGAACCGACTAATGTTGA
23s_rRNA_1 (647) CGTCGAGTTGCATGATATAGACCCGAAACCCGGTGATCTAGCCATGGGCAGGTTGAAGGTTGGGTAACACTAACTGGAGGACCGAACCGACTAATGTTGA
23s_rRNA_2 (647) CGTCGAGTTGCATGATATAGACCCGAAACCCGGTGATCTAGCCATGGGCAGGTTGAAGGTTGGGTAACACTAACTGGAGGACCGAACCGACTAATGTTGA
23s_rRNA_6 (647) CGTCGAGTTGCATGATATAGACCCGAAACCCGGTGATCTAGCCATGGGCAGGTTGAAGGTTGGGTAACACTAACTGGAGGACCGAACCGACTAATGTTGA
23s_rRNA_4 (647) CGTCGAGTTGCATGATATAGACCCGAAACCCGGTGATCTAGCCATGGGCAGGTTGAAGGTTGGGTAACACTAACTGGAGGACCGAACCGACTAATGTTGA
23S_DD1_seq_rev (692) CGTCGAGTTGCATGATATAGACCCGAAACCCGGTGATCTAGCCATGGGCAGGTTGAAGGTTGGGTAACACTAACTGGAGGACCGAACCGACTAATGTTGA
901 1000
23s_rRNA_5 (747) AAAATTAGCGGATGACCTGTGGCTGGGGGTGAAAGGCCAATCAAACCGGGAGATAGCTGGTTCTCCCCGAAATCTATTTAGGTAGAGCCTTATGTGAATA
23s_rRNA_3 (747) AAAATTAGCGGATGACCTGTGGCTGGGGGTGAAAGGCCAATCAAACCGGGAGATAGCTGGTTCTCCCCGAAATCTATTTAGGTAGAGCCTTATGTGAATA
23s_rRNA_1 (747) AAAATTAGCGGATGACCTGTGGCTGGGGGTGAAAGGCCAATCAAACCGGGAGATAGCTGGTTCTCCCCGAAATCTATTTAGGTAGAGCCTTATGTGAATA
23s_rRNA_2 (747) AAAATTAGCGGATGACCTGTGGCTGGGGGTGAAAGGCCAATCAAACCGGGAGATAGCTGGTTCTCCCCGAAATCTATTTAGGTAGAGCCTTATGTGAATA
23s_rRNA_6 (747) AAAATTAGCGGATGACCTGTGGCTGGGGGTGAAAGGCCAATCAAACCGGGAGATAGCTGGTTCTCCCCGAAATCTATTTAGGTAGAGCCTTATGTGAATA
23s_rRNA_4 (747) AAAATTAGCGGATGACCTGTGGCTGGGGGTGAAAGGCCAATCAAACCGGGAGATAGCTGGTTCTCCCCGAAATCTATTTAGGTAGAGCCTTATGTGAATA
23S_DD1_seq_rev (792) AAAATTAGCGGATGACCTGTGGCTGGGGGTGAAAGGCCAATCAAACCGGGAGATAGCTGGTTCTCCCCGAAATCTATTTAGGTAGAGCCTTATGTGAATA
1001 1100
23s_rRNA_5 (847) CCTTCGGGGGTAGAGCACTGTTTCGGCTAGGGGGCCATCCCGGCTTACCAACCCGATGCAAACTGCGAATACCGAAGAGTAATGCATAGGAGACACACGG
23s_rRNA_3 (847) CCTTCGGGGGTAGAGCACTGTTTCGGCTAGGGGGCCATCCCGGCTTACCAACCCGATGCAAACTGCGAATACCGAAGAGTAATGCATAGGAGACACACGG
23s_rRNA_1 (847) CCTTCGGGGGTAGAGCACTGTTTCGGCTAGGGGGCCATCCCGGCTTACCAACCCGATGCAAACTGCGAATACCGAAGAGTAATGCATAGGAGACACACGG
23s_rRNA_2 (847) CCTTCGGGGGTAGAGCACTGTTTCGGCTAGGGGGCCATCCCGGCTTACCAACCCGATGCAAACTGCGAATACCGAAGAGTAATGCATAGGAGACACACGG
23s_rRNA_6 (847) CCTTCGGGGGTAGAGCACTGTTTCGGCTAGGGGGCCATCCCGGCTTACCAACCCGATGCAAACTGCGAATACCGAAGAGTAATGCATAGGAGACACACGG
23s_rRNA_4 (847) CCTTCGGGGGTAGAGCACTGTTTCGGCTAGGGGGCCATCCCGGCTTACCAACCCGATGCAAACTGCGAATACCGAAGAGTAATGCATAGGAGACACACGG
23S_DD1_seq_rev (892) CCTTCGGGGGTAGAGCACTGTTTCGGCTAGGGGGCCATCCCGGCTTACCAACCCGATGCAAACTGCGAATACCGAAGAGTAATGCATAGGAGACACACGG
1101 1200
23s_rRNA_5 (947) CGGGTGCTAACGTTCGTCGTGGAGAGGGAAACAACCCAGACCGCCAGCTAAGGTCCCAAAGTTTATATTAAGTGGGAAACGAAGTGGGAAGGCTTAGACA
23s_rRNA_3 (947) CGGGTGCTAACGTTCGTCGTGGAGAGGGAAACAACCCAGACCGCACGCTAAGGTCCCAAAGTTTATATTAAGTGGGAAACGAAGTGGGAAGGCTTAGACA
23s_rRNA_1 (947) CGGGTGCTAACGTTCGTCGTGGAGAGGGAAACAACCCAGACCGCGAGCTAAGGTCCCAAAGTTTATATTAAGTGGGAAACGAAGTGGGAAGGCTTAGACA
23s_rRNA_2 (947) CGGGTGCTAACGTTCGTCGTGGAGAGGGAAACAACCCAGACCGCCAGCTAAGGTCCCAAAGTTTATATTAAGTGGGAAACGAAGTGGGAAGGCTTAGACA
23s_rRNA_6 (947) CGGGTGCTAACGTTCGTCGTGGAGAGGGAAACAACCCAGACCGCCAGCTAAGGTCCCAAAGTTTATATTAAGTGGGAAACGAAGTGGGAAGGCTTAGACA
23s_rRNA_4 (947) CGGGTGCTAACGTTCGTCGTGGAGAGGGAAACAACCCAGACCGCCAGCTAAGGTCCCAAAGTTTATATTAAGTGGGAAACGAAGTGGGAAGGCTTAGACA


23S_DD1_seq_rev (992) CGGGTGCTAACGTTCGTCGTGGAGAGGGAAACAACCCAGACCGCCAGCTAAGGTCCCAAAGTTTATATTAAGTGGGAAACGAAGTGGGAAGGCTTAGACA
1201 1300
23s_rRNA_5 (1047) GCTAGGATGTTGGCTTAGAAGCAGCCATCATTTAAAGAAAGCGTAATAGCTCACTAGTCGAGTCGGCCTGCGCGGAAGATGTAACGGGGCTCAAATATAG
23s_rRNA_3 (1047) GCTAGGATGTTGGCTTAGAAGCAGCCATCATTTAAAGAAAGCGTAATAGCTCACTAGTCGAGTCGGCCTGCGCGGAAGATGTAACGGGGCTCAAATATAG
23s_rRNA_1 (1047) GCTAGGATGTTGGCTTAGAAGCAGCCATCATTTAAAGAAAGCGTAATAGCTCACTAGTCGAGTCGGCCTGCGCGGAAGATGTAACGGGGCTCAAATATAG
23s_rRNA_2 (1047) GCTAGGATGTTGGCTTAGAAGCAGCCATCATTTAAAGAAAGCGTAATAGCTCACTAGTCGAGTCGGCCTGCGCGGAAGATGTAACGGGGCTCAAATATAG
23s_rRNA_6 (1047) GCTAGGATGTTGGCTTAGAAGCAGCCATCATTTAAAGAAAGCGTAATAGCTCACTAGTCGAGTCGGCCTGCGCGGAAGATGTAACGGGGCTCAAATATAG
23s_rRNA_4 (1047) GCTAGGATGTTGGCTTAGAAGCAGCCATCATTTAAAGAAAGCGTAATAGCTCACTAGTCGAGTCGGCCTGCGCGGAAGATGTAACGGGGCTCAAATATAG
23S_DD1_seq_rev (1092) GCTAGGATGTTGGCTTAGAAGCAGCCATCATTTAAAGAAAGCGTAATAGCTCACTAGTCGAGTCGGCCTGCGCGGAAGATGTAACGGGGCTCAAATATAG
1301 1400
23s_rRNA_5 (1147) CACCGAAGCTGCGGCATCAGGCGTATCACTAATACGCCTTACGATTAACAACTTGCGAAGGAAGAGAGCAAGTTGGTTAAGCGACCAACACGTTGAGTCG
23s_rRNA_3 (1147) CACCGAAGCTGCGGCATCAGGCGTATCACTAATACGCCTTACGATTAACAACTTGCGAAGGAAGAGAGCAAGTTGGTTAAGCGACCAACACGTTGAGTCG
23s_rRNA_1 (1147) CACCGAAGCTGCGGCATCAGGCGTATCACTAATAGGCGTTAGGATTAACAACTTGCGAAGGAAGAGAGGAAGTTGGTTAAGCGACCAAGACGTTGAGTCG
23s_rRNA_2 (1147) CACCGAAGCTGCGGCATCAGGCGTATCACTAATACGCCTTACGATTAACAACTTGCGAAGGAAGAGAGCAAGTTGGTTAAGCGACCAACAGGTTGAGTCG
23s_rRNA_6 (1147) CACCGAAGCTGCGGCATCAGGCGTATCACTAATACGGGTTAGGATTAACAACTTGCGAAGGAACAGAGCAAGTTGGTTAAGCGACGAACAGGTTGAGTCG
23s_rRNA_4 (1147) CACCGAAGCTGCGGCATCAGGCGTATCACTAATACGCCTTACGATTAACAACTTGCGAAGGAAGAGAGCAAGTTGGTTAAGCGACCAACACGTTGAGTCG
23S_DD1_seq_rev (1192) CACCGAAGCTGCGGCATCAGGCGTAA----------
1401 1500
23s_rRNA_5 (1247) GCTGTAAGCGAGAGCGAACAGAAAGGCGCGAGTGGAGCGTGAGGAATATTAGTGATACGCCTGTTGGGTAGGGGAGCGTCGTGTAAGCGGAAGAAGGTGG
23s_rRNA_3 (1247) GCTGTAAGCGAGAGGGAAGAGAAAGGCGGGAGTGGAGCGTGAGGAATATTAGTGATAGGCCTGTTGGGTAGGGGAGCGTCGTGTAAGCGGAAGAAGGTGG
23s_rRNA_1 (1247) GCTGTAAGCGAGAGCGAAGAGAAAGCGGCGAGTGGAGCGTGAGGAATATTAGTGATACGCCTGTTGGGTAGGGGAGCGTCGTGTAAGCGGAAGAAGGTGG
23s_rRNA_2 (1247) GCTGTAAGCGAGAGCGAACAGAAAGGCGCGAGTGGAGCGTGAGGAATATTAGTGATACGCCTGTTGGGTAGGGGAGCGTCGTGTAAGCGGAAGAAGGTGG
23s_rRNA_6 (1247) GCTGTAAGCGAGAGCGAACAGAAAGGCGCGAGTGGAGCGTGAGGAATATTAGTGATACGCCTGTTGGGTAGGGGAGCGTCGTGTAAGCGGAAGAAGGTGG
23s_rRNA_4 (1247) GCTGTAAGCGAGAGCGAACAGAAAGGCGCGAGTGGAGCGTGAGGAATATTAGTGATACGCCTGTTGGGTAGGGGAGCGTCGTGTAAGCGGAAGAAGGTGG
23S_DD1_seq_rev (1218) ----------GCCTGTTGGGTAGGGGAGCGTCGTGTAAGCGGAAGAAGGTGG
1501 1600
23s_rRNA_5 (1347) TTCGAGAGGGCTGCTGGACGTATCACGAGTGCGAATGCTGACATAAGTAACGATAAAACGGGTGAAAAACCCGTTCGCCGGAAGACCAAGGGTTCCTGTC
23s_rRNA_3 (1347) TTCGAGAGGGCTGCTGGACGTATCACGAGTGCGAATGCTGACATAAGTAACGATAAAACGGGTGAAAAACCCGTTCGCCGGAAGACCA-GGGTTCCTGTC
23s_rRNA_1 (1347) TTCGAGAGGGCTGCTGGACGTATCACGAGTGCGAATGCTGACATAAGTAACGATAAAACGGGTGAAAAACCCGTTCGCCGGAAGACCAAGGGTTCCTGTC
23s_rRNA_2 (1347) TTCGAGAGGGCTGCTGGACGTATCACGAGTGCGAATGCTGACATAAGTAACGATAAAACGGGTGAAAAACCCGTTCGCCGGAAGACCA-GGGTTCCTGTC
23s_rRNA_6 (1347) TTCGAGAGGGCTGCTGGACGTATCACGAGTGCGAATGCTGACATAAGTAACGATAAAACGGGTGAAAAACCCGTTCGCCGGAAGACCAAGGGTTCCTGTC
23s_rRNA_4 (1347) TTCGAGAGGGCTGCTGGACGTATCACGAGTGCGAATGCTGACATAAGTAACGATAAAACGGGTGAAAAACCCGTTCGCCGGAAGACCAAGGGTTCCTGTC
23S_DD1_seq_rev (1260) TTCGAGAGGGCTGCTGGACGTATCACGAGTGCGAATGCTGACATAAGTAACGATAAAACGGGTGAAAAACCCGTTCGCCGGAAGACCAAGGGTTCCTGTC
1601 1700
23s_rRNA_5 (1447) CAACGTTAATCGGGGCAGGGTGAGTCGGCCCCTAAGGCGAGGCTGAAGAGCGTAGTCGATGGGAAACGGGTTAATATTCCCGTACTTGTTATAATTGCGA
23s_rRNA_3 (1446) CAACGTTAATCGGGGCAGGGTGAGTCGGCCCCTAAGGCGAGGCTGAAGAGCGTAGTCGATGGGAAACGGGTTAATATTCCCGTACTTGTTATAATTGCGA
23s_rRNA_1 (1447) CAACGTTAATCGGGGCAGGGTGAGTCGGCCCCTAAGGCGAGGCTGAAGAGCGTAGTCGATGGGAAACGGGTTAATATTCCCGTACTTGTTATAATTGCGA
23s_rRNA_2 (1446) CAACGTTAATCGGGGCAGGGTGAGTCGGCCCCTAAGGCGAGGCTGAAGAGCGTAGTCGATGGGAAACGGGTTAATATTCCCGTACTTGTTATAATTGCGA
23s_rRNA_6 (1447) CAACGTTAATCGGGGCACGCTGAGTCGGCCCCTAAGGCGAGGCTGAAGAGCGTAGTCGATGGGAAACGGGTTAATATTCCCGTACTTGTTATAATTGCGA
23s_rRNA_4 (1447) CAACGTTAATCGGGGCAGGGTGAGTCGGCCCCTAAGGCGAGGCTGAAGAGCGTAGTCGATGGGAAACGGGTTAATATTCCCGTACTTGTTATAATTGCGA
23S_DD1_seq_rev (1360) CAACGTTAATCGGGGCAGGGTGAGTCGGCCCCTAAGGCGAGGCTGAAGAGCGTAGTCGATGGGAAACGGGTTAATATTCCCGTACTTGTTATAATTGCGA
1701 1800
23s_rRNA_5 (1547) TGTGGGGACGGAGTAGGTTAGGTTATCGACCTGTTGGAAATTGGTCGTTTAAGTTGGTAGGTGGAGCGTTTAGGCAAATCCGGACGCTTATCAACACCGAG
23s_rRNA_3 (1546) TGTGGGGACGGAGTAGGTTAGGTTATCGACCTGTTGGAAATTGGTCGTTTAAGTTGGTAGGTGGAGCGTTTAGGCAAATCCGGACGCTTATCAACACCGAG
23s_rRNA_1 (1547) TGTGGGGACGGAGTAGGTTAGGTTATCGACCTGTTGGAAATTGGTCGTTTAAGTTGGTAGGTGGAGCGTTTAGGCAAATCCGGACGCTTATCAACACCGAG
23s_rRNA_2 (1546) TGTGGGGACGGAGTAGGTTAGGTTATCGACCTGTTGGAAATTGGTCGTTTAAGTTGGTAGGTGGAGCGTTTAGGCAAATCCGGACGCTTATCAACACCGAG
23s_rRNA_6 (1547) TGTGGGGACGGAGTAGGTTAGGTTATCGACCTGTTGGAAATTGGTCGTTTAAGTTGGTAGGTGGAGCGTTTAGGCAAATCCGGACGCTTATCAACACCGAG
23s_rRNA_4 (1547) TGTGGGGACGGAGTAGGTTAGGTTATCGACCTGTTGGAAATTGGTCGTTTAAGTTGGTAGGTGGAGCGTTTAGGCAAATCCGGACGCTTATCAACACCGAG
23S_DD1_seq_rev (1460) TGTGGGGACGGAGTAGGTTAGGTTATCGACCTGTTGGAAAAGGTCGTTTAAGTTGGTAGGTGGAGCGTTTAGGCAAATCCGGACGCTTATCAACACCGAG
1801 1900


23s_rRNA_5 (1647) AGATGATGACGAGGCGCTAAGGTGCCGAAGTAACCGATGCCACGCTTCCAGGAAAAGCCACTAAGCGTCAGATTATAATAAACCGTACTATAAACCGACA
23s_rRNA_3 (1646) AGATGATGACGAGGCGCTAAGGTGCCGAAGTAACCGATACCACACTTCCAGGAAAAGCCACTAAGCGTCAGATTATAATAAACCGTACTATAAACCGACA
23s_rRNA_1 (1647) AGATGATGACGAGGCGCTAAGGTGCCGAAGTAACCGATACCACACTTCCAGGAAAAGCCACTAAGCGTCAGATTATAATAAACCGTACTATAAACCGACA
23s_rRNA_2 (1646) AGATGATGACGAGGCGCTAAGGTGCCGAAGTAACCGATACCACACTTCCAGGAAAAGCCACTAAGCGTCAGATTATAATAAACCGTACTATAAACCGACA
23s_rRNA_6 (1647) AGATGATGACGAGGCGCTAAGGTGCCGAAGTAACCGATACCACACTTCCAGGAAAAGCCACTAAGCGTCAGATTATAATAAACCGTACTATAAACCGACA
23s_rRNA_4 (1647) AGATGATGACGAGGCGCTAAGGTGCCGAAGTAACCGATACCACACTTCCAGGAAAAGCCACTAAGCGTCAGATTATAATAAACCGTACTATAAACCGACA
23S_DD1_seq_rev (1560) AGATGATGACGAGGCGCTAAGGTGCCGAAGTAACCGATACCACACTTCCAGGAAAAGCCACTAAGCGTCAGATTATAATAAACCGTACTATAAACCGACA
1901 2000
23s_rRNA_5 (1747) CAGGTGGTCAGGTAGAGAATACTCAGGCGCTTGAGAGAACTCGGGTGAAGGAACTAGGCAAAATAGCACCGTAACTTCGGGAGAAGGTGCGCCGGCGTAG
23s_rRNA_3 (1746) CAGGTGGTCAGGTAGAGAATACTCAGGCGCTTGAGAGAACTCGGGTGAAGGAACTAGGCAAAATAGCACCGTAACTTCGGGAGAAGGTGCGCCGGCGTAG
23s_rRNA_1 (1747) CAGGTGGTCAGGTAGAGAATACTCAGGCGCTTGAGAGAACTCGGGTGAAGGAACTAGGCAAAATAGCACCGTAACTTCGGGAGAAGGTGCGCCGGCGTAG
23s_rRNA_2 (1746) CAGGTGGTCAGGTAGAGAATACTCAGGCGCTTGAGAGAACTCGGGTGAAGGAACTAGGCAAAATAGCACCGTAACTTCGGGAGAAGGTGCGCCGGCGTAG
23s_rRNA_6 (1747) CAGGTGGTCAGGTAGAGAATACTCAGGCGCTTGAGAGAACTCGGGTGAAGGAACTAGGCAAAATAGCACCGTAACTTCGGGAGAAGGTGCGCCGGCGTAG
23s_rRNA_4 (1747) CAGGTGGTCAGGTAGAGAATACTCAGGCGCTTGAGAGAACTCGGGTGAAGGAACTAGGCAAAATAGCACCGTAACTTCGGGAGAAGGTGCGCCGGCGTAG
23S_DD1_seq_rev (1660) CAGGTGGTCAGGTAGAGAATACTCAGGCGCTTGAGAGAACTCGGGTGAAGGAACTAGGCAAAATAGCACCGTAACTTCGGGAGAAGGTGCGCCGGCGTAG
2001 2100
23s_rRNA_5 (1847) ATTGTAGAGGTATACCCTTGAAGGTTGAACCGGTCGAAGATACCAGCTGGCTGCAACTGTTTATTAAAAACACAGCACTCTGCAAACACGAAAGTGGACG
23s_rRNA_3 (1846) ATTGTAGAGGTATACCCTTGAAGGTTGAACCGGTCGAAGATACCAGCTGGCTGCAACTGTTTATTAAAAACACAGCACTCTGCAAACACGAAAGTGGACG
23s_rRNA_1 (1847) ATTGTAGAGGTATACCCTTGAAGGTTGAACCGGTCGAAGATACCAGCTGGCTGCAACTGTTTATTAAAAACACAGCACTCTGCAAACACGAAAGTGGACG
23s_rRNA_2 (1846) ATTGTAGAGGTATACCCTTGAAGGTTGAACCGGTCGAAGATACCAGCTGGCTGCAACTGTTTATTAAAAACACAGCACTCTGCAAACACGAAAGTGGACG
23s_rRNA_6 (1847) ATTGTAGAGGTATACCCTTGAAGGTTGAACCGGTCGAAGATACCAGCTGGCTGCAACTGTTTATTAAAAACACAGCACTCTGCAAACACGAAAGTGGACG
23s_rRNA_4 (1847) ATTGTAGAGGTATACCCTTGAAGGTTGAACCGGTCGAAGATACCAGCTGGCTGCAACTGTTTATTAAAAACACAGCACTCTGCAAACACGAAAGTGGACG
23S_DD1_seq_rev (1760) ATTGTAGAGGTATACCCTTGAAGGTTGAACCGGTCGAAGTGACCCGCTGGCTGCAACTGTTTATTAAAAACACAGCACTCTGCAAACACGAAAGTGGACG
2101 2200
23s_rRNA_5 (1947) TATAGGGTGTGATGCCTGCCCGGTGCTGGAAGGTTAATTGATGGCGTTATCGCAAGAGAAGCGCCTGATCGAAGCCCCAGTAAACGGCGGCCGTAACTAT
23s_rRNA_3 (1946) TATAGGGTGTGATGCCTGCCCGGTGCTGGAAGGTTAATTGATGGCGTTATCGCAAGAGAAGCGCCTGATCGAAGCCCCAGTAAACGGCGGCCGTAACTAT
23s_rRNA_1 (1947) TATAGGGTGTGATGCCTGCCCGGTGCTGGAAGGTTAATTGATGGCGTTATCGCAAGAGAAGCGCCTGATCGAAGCCCCAGTAAACGGCGGCCGTAACTAT
23s_rRNA_2 (1946) TATAGGGTGTGATGCCTGCCCGGTGCTGGAAGGTTAATTGATGGCGTTATCGCAAGAGAAGCGCCTGATCGAAGCCCCAGTAAACGGCGGCCGTAACTAT
23s_rRNA_6 (1947) TATAGGGTGTGATGCCTGCCCGGTGCTGGAAGGTTAATTGATGGCGTTATCGCAAGAGAAGCGCCTGATCGAAGCCCCAGTAAACGGCGGCCGTAACTAT
23s_rRNA_4 (1947) TATAGGGTGTGATGCCTGCCCGGTGCTGGAAGGTTAATTGATGGCGTTATCGCAAGAGAAGCGCCTGATCGAAGCCCCAGTAAACGGCGGCCGTAACTAT
23S_DD1_seq_rev (1860) TATAGGGTGTGATGCCTGCCCGGTGCTGGAAGGTTAATTGATGGCGTTATCGCAAGAGAAGCGCCTGATCGAAGCCCCAGTAAACGGCGGCCGTAACTAT
2201 2300
23s_rRNA_5 (2047) AACGGTCCTAAGGTAGCGAAATTCCTTGTCGGGTAAGTTCCGACCTGCACGAATGGCATAATGATGGCCAGGCTGTCTCCACCCGAGACTCAGTGAAATT
23s_rRNA_3 (2046) AACGGTCCTAAGGTAGCGAAATTCCTTGTCGGGTAAGTTCCGACCTGCACGAATGGCATAATGATGGCCAGGCTGTCTCCACCCGAGACTCAGTGAAATT
23s_rRNA_1 (2047) AACGGTCCTAAGGTAGCGAAATTCCTTGTCGGGTAAGTTCCGACCTGCACGAATGGCATAATGATGGCCAGGCTGTCTCCACCCGAGACTCAGTGAAATT
23s_rRNA_2 (2046) AACGGTCCTAAGGTAGCGAAATTCCTTGTCGGGTAAGTTCCGACCTGCACGAATGGCATAATGATGGCCAGGCTGTCTCCACCCGAGACTCAGTGAAATT
23s_rRNA_6 (2047) AACGGTCCTAAGGTAGCGAAATTCCTTGTCGGGTAAGTTCCGACCTGCACGAATGGCATAATGATGGCCAGGCTGTCTCCACCCGAGACTCAGTGAAATT
23s_rRNA_4 (2047) AACGGTCCTAAGGTAGCGAAATTCCTTGTCGGGTAAGTTCCGACCTGCACGAATGGCATAATGATGGCCAGGCTGTCTCCACCCGAGACTCAGTGAAATT
23S_DD1_seq_rev (1960) AACGGTCCTAAGGTAGCGAAATTCCTTGTCGGGTAAGTTCCGACCTGCACGAATGGCATAATGATGGCCAGGCTGTCTCCACCCGAGACTCAGTGAAATT
2301 2400
23s_rRNA_5 (2147) GAAATCGCCGTGAAGATGCGGTGTACCCGCGGCTAGACGGAAAGACCCCGTGAACCTTTACTATAGCTTGACACTGAACCTTGAATTTTGATGTGTAGGA
23s_rRNA_3 (2146) GAAATCGCCGTGAAGATGCGGTGTACCCGCGGCTAGACGGAAAGACCCCGTGAACCTTTACTATAGCTTGACACTGAACCTTGAATTTTGATGTGTAGGA
23s_rRNA_1 (2147) GAAATCGCCGTGAAGATGCGGTGTACCCGCGGCTAGACGGAAAGACCCCGTGAACCTTTACTATAGCTTGACACTGAACCTTGAATTTTGATGTGTAGGA
23s_rRNA_2 (2146) GAAATCGCCGTGAAGATGCGGTGTACCCGCGGCTAGACGGAAAGACCCCGTGAACCTTTACTATAGCTTGACACTGAACCTTGAATTTTGATGTGTAGGA
23s_rRNA_6 (2147) GAAATCGCCGTGAAGATGCGGTGTACCCGCGGCTAGACGGAAAGACCCCGTGAACCTTTACTATAGCTTGACACTGAACCTTGAATTTTGATGTGTAGGA
23s_rRNA_4 (2147) GAAATCGCCGTGAAGATGCGGTGTACCCGCGGCTAGACGGAAAGACCCCGTGAACCTTTACTATAGCTTGACACTGAACCTTGAATTTTGATGTGTAGGA
23S_DD1_seq_rev (2060) GAAATCGCCGTGAAGATGCGGTGTACCCGCGGCTAGACGGAAAGACCCCGTGAACCTTTACTATAGCTTGACACTGAACCTTGAATTTTGATGTGTAGGA
2401 2500
23s_rRNA_5 (2247) TAGGTGGGAGGCTTTGAAGCGGTAACGCCAGTTATCGTGGAGCCATCCTTGAAATACCACCCTTTAACGTTTGATGTTCTAACGAAGTGCCGGAACGGG
23s_rRNA_3 (2246) TAGGTGGGAGGCTTTGAAGCGGTAACGCCAGTTATCGTGGAGCCATCCTTGAAATACCACCCTTTAACGTTTGATGTTCTAACGAAGTGCCGGAACGGG


23s_rRNA_1 (2247) TAGGTGGGAGGCTTTGAAGCGGTAACGCCAGTTATCGTGGAGCCATCCTTGAAATACCACCCTTTAACGTTTGATGTTCTAACGAAGTGCCTGGAACGGG
23s_rRNA_2 (2246) TAGGTGGGAGGCTTTGAAGCGGTAACGCCAGTTATCGTGGAGCCATCCTTGAAATACCACCCTTTAACGTTTGATGTTCTAACGAAGTGCCTGGAACGGG
23s_rRNA_6 (2247) TAGGTGGGAGGCTTTGAAGCGGTAACGCCAGTTATCGTGGAGCCATCCTTGAAATACCACCCTTTAACGTTTGATGTTCTAACGAAGTGCCTGGAACGGG
23s_rRNA_4 (2247) TAGGTGGGAGGCTTTGAAGCGGTAACGCCAGTTATCGTGGAGCCATCCTTGAAATACCACCCTTTAACGTTTGATGTTCTAACGAAGTGCCTGGAACGGG
23S_DD1_seq_rev (2160) TAGGTGGGAGGCTTTGAAGCGGTAACGCCAGTTATCGTGGAGCCATCCTTGAAATACCACCCTTTAACGTTTGATGTTCTAACGAAGTGCCCGGAACGGG
2501 2600
23s_rRNA_5 (2347) TACTCGGACAGTGTCTGGTGGGTAGTTTGACTGGGGCGGTCTCCTCCCAAAGAGTAACGGAGGAGCACGAAGGTTTGCTAATGACGGTCGGACATCGTCA
23s_rRNA_3 (2346) TACTCGGACAGTGTCTGGTGGGTAGTTTGACTGGGGCGGTCTCCTCCCAAAGAGTAACGGAGGAGCACGAAGGTTTGCTAATGACGGTCGGACATCGTCA
23s_rRNA_1 (2347) TACTCGGACAGTGTCTGGTGGGTAGTTTGACTGGGGCGGTCTCCTCCCAAAGAGTAACGGAGGAGCACGAAGGTTTGCTAATGACGGTCGGACATCGTCA
23s_rRNA_2 (2346) TACTCGGACAGTGTCTGGTGGGTAGTTTGACTGGGGCGGTCTCCTCCCAAAGAGTAACGGAGGAGCACGAAGGTTTGCTAATGACGGTCGGACATCGTCA
23s_rRNA_6 (2347) TACTCGGACAGTGTCTGGTGGGTAGTTTGACTGGGGCGGTCTCCTCCCAAAGAGTAACGGAGGAGCACGAAGGTTTGCTAATGACGGTCGGACATCGTCA
23s_rRNA_4 (2347) TACTCGGACAGTGTCTGGTGGGTAGTTTGACTGGGGCGGTCTCCTCCCAAAGAGTAACGGAGGAGCACGAAGGTTTGCTAATGACGGTCGGACATCGTCA
23S_DD1_seq_rev (2260) TACTCGGACAGTGTCTGGTGGGTAGTTTGACTGGGGCGGTCTCCTCCCAAAGAGTAACGGAGGAGCACGAAGGTTTGCTAATGACGGTCGGACATCGTCA
2601 2700
23s_rRNA_5 (2447) GGTTAGTGCAATGGTATAAGCAAGCTTAACTGCGAGACGGACAAGTCGAGCAGGTGCGAAAGCAGGTCATAGTGATCCGGTGGTTCTGAATGGAAGGGCC
23s_rRNA_3 (2446) GGTTAGTGCAATGGTATAAGCAAGCTTAACTGCGAGACGGACAAGTCGAGCAGGTGCGAAAGCAGGTCATAGTGATCCGGTGGTTCTGAATGGAAGGGCC
23s_rRNA_1 (2447) GGTTAGTGCAATGGTATAAGCAAGCTTAACTGCGAGACGGACAAGTCGAGCAGGTGCGAAAGCAGGTCATAGTGATCCGGTGGTTCTGAATGGAAGGGCC
23s_rRNA_2 (2446) GGTTAGTGCAATGGTATAAGCAAGCTTAACTGCGAGACGGACAAGTCGAGCAGGTGCGAAAGCAGGTCATAGTGATCCGGTGGTTCTGAATGGAAGGGCC
23s_rRNA_6 (2447) GGTTAGTGCAATGGTATAAGCAAGCTTAACTGCGAGACGGACAAGTCGAGCAGGTGCGAAAGCAGGTCATAGTGATCCGGTGGTTCTGAATGGAAGGGCC
23s_rRNA_4 (2447) GGTTAGTGCAATGGTATAAGCAAGCTTAACTGCGAGACGGACAAGTCGAGCAGGTGCGAAAGCAGGTCATAGTGATCCGGTGGTTCTGAATGGAAGGGCC
23S_DD1_seq_rev (2360) GGTTAGTGCAATGGTATAAGCAAGCTTAACTGCGAGACGGACAAGTCGAGCAGGTGCGAAAGCAGGTCATAGTGATCCGGTGGTTCTGAATGGAAGGGCC
2701 2800
23s_rRNA_5 (2547) ATCGCTCAACGGATAAAAGGTACTCCGGGGATAACAGGCTGATACCGCCCAAGAGTTCATATCGACGGCGGTGTTTGGCACCTCGATGTCGGCTCATCAC
23s_rRNA_3 (2546) ATCGCTCAACGGATAAAAGGTACTCCGGGGATAACAGGCTGATACCGCCCAAGAGTTCATATCGACGGCGGTGTTTGGCACCTCGATGTCGGCTCATCAC
23s_rRNA_1 (2547) ATCGCTCAACGGATAAAAGGTACTCCGGGGATAACAGGCTGATACCGCCCAAGAGTTCATATCGACGGCGGTGTTTGGCACCTCGATGTCGGCTCATCAC
23s_rRNA_2 (2546) ATCGCTCAACGGATAAAAGGTACTCCGGGGATAACAGGCTGATACCGCCCAAGAGTTCATATCGACGGCGGTGTTTGGCACCTCGATGTCGGCTCATCAC
23s_rRNA_6 (2547) ATCGCTCAACGGATAAAAGGTACTCCGGGGATAACAGGCTGATACCGCCCAAGAGTTCATATCGACGGCGGTGTTTGGCACCTCGATGTCGGCTCATCAC
23s_rRNA_4 (2547) ATCGCTCAACGGATAAAAGGTACTCCGGGGATAACAGGCTGATACCGCCCAAGAGTTCATATCGACGGCGGTGTTTGGCACCTCGATGTCGGCTCATCAC
23S_DD1_seq_rev (2460) ATCGCTCAACGGATAAAAGGTACTCCGGGGATAACAGGCTGATACCGCCCAAGAGTTCATATCGACGGCGGTGTTTGGCACCTCGATGTCGGCTCATCAC
2801 2900
23s_rRNA_5 (2647) ATCCTGGGGCTGAAGTAGGTCCCAAGGGTATGGCTGTTCGCCATTTAAAGTGGTACGCGAGCTGGGTTTAAAACGTCGTGAGACAGTTTGGTCCCTATCT
23s_rRNA_3 (2646) ATCCTGGGGCTGAAGTAGGTCCCAAGGGTATGGCTGTTCGCCATTTAAAGTGGTACGCGAGCTGGGTTTAAAACGTCGTGAGACAGTTTGGTCCCTATCT
23s_rRNA_1 (2647) ATCCTGGGGCTGAAGTAGGTCCCAAGGGTATGGCTGTTCGCCATTTAAAGTGGTACGCGAGCTGGGTTTAAAACGTCGTGAGACAGTTTGGTCCCTATCT
23s_rRNA_2 (2646) ATCCTGGGGCTGAAGTAGGTCCCAAGGGTATGGCTGTTCGCCATTTAAAGTGGTACGCGAGCTGGGTTTAAAACGTCGTGAGACAGTTTGGTCCCTATCT
23s_rRNA_6 (2647) ATCCTGGGGCTGAAGTAGGTCCCAAGGGTATGGCTGTTCGCCATTTAAAGTGGTACGCGAGCTGGGTTTAAAACGTCGTGAGACAGTTTGGTCCCTATCT
23s_rRNA_4 (2647) ATCCTGGGGCTGAAGTAGGTCCCAAGGGTATGGCTGTTCGCCATTTAAAGTGGTACGCGAGCTGGGTTTAAAACGTCGTGAGACAGTTTGGTCCCTATCT
23S_DD1_seq_rev (2560) ATCCTGGGGCTGAAGTAGGTCCCAAGGGTATGGCTGTTCGCCATTTAAAGTGGTACGCGAGCTGGGTTTAAAACGTCGTGAGACAGTTTGGTCCCTATCT
2901 3000
23s_rRNA_5 (2747) GCCGTGGGCGTTGGAGAATTGAGAGGGGCTGCTCCTAGTACGAGAGGACCGGAGTGGACGCATCACTGGTGTTCCGGTTGTGTCGCCAGACGCATTGCCG
23s_rRNA_3 (2746) GCCGTGGGCGTTGGAGAATTGAGAGGGGCTGCTCCTAGTACGAGAGGACCGGAGTGGACGCATCACTGGTGTTCCGGTTGTGTCGCCAGACGCATTGCCG
23s_rRNA_1 (2747) GCCGTGGGCGTTGGAGAATTGAGAGGGGCTGCTCCTAGTACGAGAGGACCGGAGTGGACGCATCACTGGTGTTCCGGTTGTGTCGCCAGACGCATTGCCG
23s_rRNA_2 (2746) GCCGTGGGCGTTGGAGAATTGAGAGGGGCTGCTCCTAGTACGAGAGGACCGGAGTGGACGCATCACTGGTGTTCCGGTTGTGTCGCCAGACGCATTGCCG
23s_rRNA_6 (2747) GCCGTGGGCGTTGGAGAATTGAGAGGGGCTGCTCCTAGTACGAGAGGACCGGAGTGGACGCATCACTGGTGTTCCGGTTGTGTCGCCAGACGCATTGCCG
23s_rRNA_4 (2747) GCCGTGGGCGTTGGAGAATTGAGAGGGGCTGCTCCTAGTACGAGAGGACCGGAGTGGACGCATCACTGGTGTTCCGGTTGTGTCGCCAGACGCATTGCCG
23S_DD1_seq_rev (2660) GCCGTGGGCGTTGGAGAATTGAGAGGGGCTGCTCCTAGTACGAGAGGACCGGAGTGGACGCATCACTGGTGTTCCGGTTGTGTCGCCAGACGCATTGCCG
3001 3100
23s_rRNA_5 (2847) GGTAGCTACATGCGGAAGAGATAAGTGCTGAAAGCATCTAAGCACGAAACTTGCCTCGAGATGAGTTCTCCCAGTATTTAATACTGTAAGGGTTGTTGGA
23s_rRNA_3 (2846) GGTAGCTACATGCGGAAGAGATAAGTGCTGAAAGCATCTAAGCACGAAACTTGCCTCGAGATGAGTTCTCCCAGTATTTAATACTGTAAGGGTTGTTGGA
23s_rRNA_1 (2847) GGTAGCTACATGCGGAAGAGATAAGTGCTGAAAGCATCTAAGCACGAAACTTGCCTCGAGATGAGTTCTCCCAGTATTTAATACTGTAAGGGTTGTTGGA
23s_rRNA_2 (2846) GGTAGCTACATGCGGAAGAGATAAGTGCTGAAAGCATCTAAGCACGAAACTTGCCTCGAGATGAGTTCTCCCAGTATTTAATACTGTAAGGGTTGTTGGA


23s_rRNA_6 (2847) GGTAGCTACATGCGGAAGAGATAAGTGCTGAAAGCATCTAAGCACGAAACTTGCCTCGAGATGAGTTCTCCCAGTATTTAATACTGTAAGGGTTGTTGGA
23s_rRNA_4 (2847) GGTAGCTACATGCGGAAGAGATAAGTGCTGAAAGCATCTAAGCACGAAACTTGCCTCGAGATGAGTTCTCCCAGTATTTAATACTGTAAGGGTTGTTGGA
23S_DD1_seq_rev (2760) GGTAGCTACATGCGGAAGAGATAAGTGCTGAAAGCATCTAAGCACGAAACTTGCCTCGAGATGAGTTCTCCCAGTATTTAATACTGTAAGGGTTGTTGGA
3101
3200
23s_rRNA_5 (2947) GACGACGACGTAGATAGGCCGGGTGTGTAAGCGTTGCGAGACGTTGAGCTAACCGGTACTAATTGCCCGAGAGGCTTA----------
23s_rRNA_3 (2946) GACGACGACGTAGATAGGCCGGGTGTGTAAGCGTTGCGAGACGTTGAGCTAACCGGTACTAATTGCCCGAGAGGCTTA----------
23s_rRNA_1 (2947) GACGACGACGTAGATAGGCCGGGTGTGTAAGCGTTGCGAGACGTTGAGCTAACCGGTACTAATTGCCCGAGAGGCTTA----------
23s_rRNA_2 (2946) GACGACGACGTAGATAGGCCGGGTGTGTAAGCGTTGCGAGACGTTGAGCTAACCGGTACTAATTGCCCGAGAGGCTTA----------
23s_rRNA_6 (2947) GACGACGACGTAGATAGGCCGGGTGTGTAAGCGTTGCGAGACGTTGAGCTAACCGGTACTAATTGCCCGAGAGGCTTA----------
23s_rRNA_4 (2947) GACGACGACGTAGATAGGCCGGGTGTGTAAGCGTTGCGAGACGTTGAGCTAACCGGTACTAATTGCCCGAGAGGCTTA----------
23S_DD1_seq_rev (2860) GACGACGACGTAGATAGGCCGGGTGTGTAAGCGTTGCGAGACGTTGAGCTAACCGGTACTAATTGCCCGAGAGGCTTAGCCATACAACGCTCAAGTGTTT
3201
3269
23s_rRNA_5 (3025) ----------
23s_rRNA_3 (3024) ----------
23s_rRNA_1 (3025) ----------
23s_rRNA_2 (3024) ----------
23s_rRNA_6 (3025) ----------
23s_rRNA_4 (3025) ----------
23S_DD1_seq_rev (2960) TTGGTAGTGAAAGTTATTACGGAATAAGTAAGTAGTCAGGGAATCGGCT----------

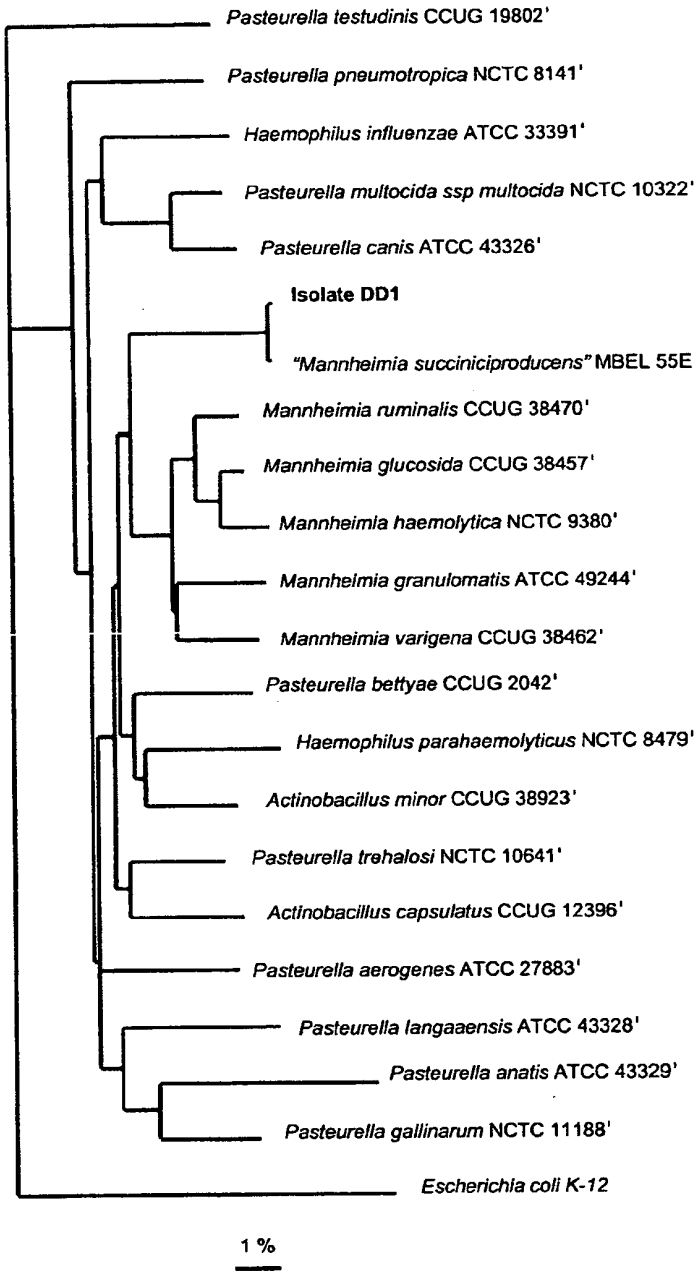

Pasteurella testudinis CCUG 19802'
Pasteurella pneumotropica NCTC 8141'
Haemophilus influenzae ATCC 33391'
Pasteurella multocida ssp multocida NCTC 10322'
Pasteurella canis ATCC 43326'
Isolate DD1
"Mannheimia succiniciproducens" MBEL 55E
Mannheimia ruminalis CCUG 38470'
Mannheimia glucosida CCUG 38457'
Mannheimia haemolytica NCTC 9380'
Mannheimia granulomatis ATCC 49244'
Mannheimia varigena CCUG 38462'
Pasteurella bettyae CCUG 2042'
Haemophilus parahaemolyticus NCTC 8479'
Actinobacillus minor CCUG 38923'
Pasteurella trehalosi NCTC 10641'
Actinobacillus capsulatus CCUG 12396'
Pasteurella aerogenes ATCC 27883'
Pasteurella langaaensis ATCC 43328'
Pasteurella anatis ATCC 43329'
Pasteurella gallinarum NCTC 11188'
Escherichia coli K-12
1 %

Fig.1

```
   1 tttgatcctg gctcagattg aacgctggcg gcaggcttaa cacatgcaag tcgaacggta
  61 gcgggaggaa agcttgcttt ctttgccgac gagtggcgga cgggtgagta atgcttgggg
 121 atctggctta tggaggggga taacgacggg aaactgtcgc taataccgcg taatatcttc
 181 ggattaaagg gtgggacttt cgggccaccc gccataagat gagcccaagt gggattaggt
 241 agttggtggg gtaaaggcct accaagccga cgatctctag ctggtctgag aggatgacca
 301 gccacactgg aactgagaca cggtccagac tcctacggga ggcagcagtg gggaatattg
 361 cacaatgggg ggaaccctga tgcagccatg ccgcgtgaat gaagaaggcc ttcgggttgt
 421 aaagttcttt cggtgacgag gaaggtgttt gttttaatag gacaagcaat tgacgttaat
 481 cacagaagaa gcaccggcta actccgtgcc agcagccgcg gtaatacgga gggtgcgagc
 541 gttaatcgga ataactgggc gtaaagggca tgcaggcgga cttttaagtg agatgtgaaa
 601 gccccgggct taacctggga attgcatttc agactgggag tctagagtac tttagggagg
 661 ggtagaattc cacgtgtagc ggtgaaatgc gtagagatgt ggaggaatac cgaaggcgaa
 721 ggcagccccc tgggaagata ctgacgctca tatgcgaaag cgtggggagc aaacaggatt
 781 agataccctg gtagtccacg cggtaaacgc tgtcgatttg gggattgggc tttaggcctg
 841 gtgctcgtag ctaacgtgat aaatcgaccg cctggggagt acggccgcaa ggttaaaact
 901 caaatgaatt gacgggggcc cgcacaagcg gtggagcatg tggtttaatt cgatgcaacg
 961 cgaagaacct tacctactct tgacatccag agaatcctgt agagatacgg gagtgccttc
1021 gggagctctg agacaggtgc tgcatggctg tcgtcagctc gtgttgtgaa atgttgggtt
1081 aagtcccgca acgagcgcaa cccttatcct ttgttgccag catgtaaaga tgggaactca
1141 aaggagactg ccggtgacaa accggaggaa ggtggggatg acgtcaagtc atcatggccc
1201 ttacgagtag ggctacacac gtgctacaat ggtgcataca gagggcggcg ataccgcgag
1261 gtagagcgaa tctcagaaag tgcatcgtag tccggattgg agtctgcaac tcgactccat
1321 gaagtcggaa tcgctagtaa tcgcaaatca gaatgttgcg gtgaatacgt tcccgggcct
1381 tgtacacacc gcccgtcaca ccatgggagt gggttgtacc agaagtagat agcttaacct
1441 tcgggggggg cgtttaccac ggtatgattc atgactgggg tgaagtcgta acaaggtaac
1501 cgtaggggaa cctgcgg
```

Fig.2

```
agtaataacg aacgacacag gtataagaat acttgaggtt gtatggttaa gtgactaagc      60
gtacaaggtg gatgccttgg caatcagagg cgaagaagga cgtgctaatc tgcgaaaagc     120
ttgggtgagt tgataagaag cgtctaaccc aagatatccg aatggggcaa cccagtagat     180
gaagaatcta ctatcaataa ccgaatccat aggttattga ggcaaaccgg gagaactgaa     240
acatctaagt accccgagga aaagaaatca accgagatta cgtcagtagc ggcgagcgaa     300
agcgtaagag ccggcaagtg atagcatgag gattagagga atcggctggg aagccgggcg     360
gcacagggtg atagccccgt acttgaaaat cattgtgtgg tactgagctt gcgagaagta     420
gggcgggaca cgagaaatcc tgtttgaaga agggggggacc atcctccaag gctaaatact     480
cctgattgac cgatagtgaa ccagtactgt gaaggaaagg cgaaaagaac cccggtgagg     540
ggagtgaaat agaacctgaa accttgtacg tacaagcagt gggagcccgc gagggtgact     600
gcgtaccttt tgtataatgg gtcagcgact tatattatgt agcgaggtta accgaatagg     660
ggagccgaag ggaaaccgag tcttaactgg gcgtcgagtt gcatgatata gacccgaaac     720
ccggtgatct agccatgggc aggttgaagg ttgggtaaca ctaactggag gaccgaaccg     780
actaatgttg aaaaattagc ggatgacctg tggctggggg tgaaaggcca atcaaaccgg     840
gagatagctg gttctccccg aaatctattt aggtagagcc ttatgtgaat accttcgggg     900
gtagagcact gtttcggcta gggggccatc ccggcttacc aacccgatgc aaactgcgaa     960
taccgaagag taatgcatag gagacacacg gcgggtgcta acgttcgtcg tggagaggga    1020
aacaacccag accgccagct aaggtcccaa agtttatatt aagtgggaaa cgaagtggga    1080
aggcttagac agctaggatg ttggcttaga agcagccatc atttaaagaa agcgtaatag    1140
ctcactagtc gagtcggcct gcgcggaaga tgtaacgggg ctcaaatata gcaccgaagc    1200
tgcggcatca ggcgtaagcc tgttgggtag gggagcgtcg tgtaagcgga agaaggtggt    1260
tcgagagggc tgctggacgt atcacgagtg cgaatgctga cataagtaac gataaaacgg    1320
gtgaaaaacc cgttcgccgg aagaccaagg gttcctgtcc aacgttaatc ggggcagggt    1380
gagtcggccc ctaaggcgag gctgaagagc gtagtcgatg ggaaacgggt taatattccc    1440
gtacttgtta taattgcgat gtggggacgg agtaggttag gttatcgacc tgttggaaaa    1500
ggtcgtttaa gttggtaggt ggagcgttta ggcaaatccg gacgcttatc aacaccgaga    1560
gatgatgacg aggcgctaag gtgccgaagt aaccgatacc acacttccag gaaaagccac    1620
taagcgtcag attataataa accgtactat aaaccgacac aggtggtcag gtagagaata    1680
ctcaggcgct tgagagaact cgggtgaagg aactaggcaa aatagcaccg taacttcggg    1740
agaaggtgcg ccggcgtaga ttgtagaggt ataccccttga aggttgaacc ggtcgaagtg    1800
acccgctggc tgcaactgtt tattaaaaac acagcactct gcaaacacga aagtggacgt    1860
atagggtgtg atgcctgccc ggtgctggaa ggttaattga tggcgttatc gcaagagaag    1920
cgcctgatcg aagccccagt aaacggcggc cgtaactata acggtcctaa ggtagcgaaa    1980
ttccttgtcg ggtaagttcc gacctgcacg aatggcataa tgatggccag gctgtctcca    2040
cccgagactc agtgaaattg aaatcgccgt gaagatgcgg tgtacccgcg gctagacgga    2100
aagaccccgt gaacctttac tatagcttga cactgaacct tgaattttga tgtgtaggat    2160
aggtgggagg ctttgaagcg gtaacgccag ttatcgtgga gccatccttg aaataccacc    2220
ctttaacgtt tgatgttcta acgaagtgcc cggaacgggt actcggacag tgtctggtgg    2280
gtagtttgac tggggcggtc tcctcccaaa gagtaacgga ggagcacgaa ggtttgctaa    2340
tgacggtcgg acatcgtcag gttagtgcaa tggtataagc aagcttaact gcgagacgga    2400
caagtcgagc aggtgcgaaa gcaggtcata gtgatccggt ggttctgaat ggaagggcca    2460
tcgctcaacg gataaaaggt actccgggga taacaggctg ataccgccca agagttcata    2520
tcgacggcgg tgtttggcac ctcgatgtcg gctcatcaca tcctggggct gaagtaggtc    2580
ccaagggtat ggctgttcgc catttaaagt ggtacgcgag ctgggtttaa aacgtcgtga    2640
gacagtttgg tccctatctg ccgtgggcgt tggagaattg agaggggctg ctcctagtac    2700
gagaggaccg gagtggacgc atcactggtg ttccggttgt gtcgccagac gcattgccgg    2760
gtagctacat gcggaagaga taagtgctga aagcatctaa gcacgaaact tgcctcgaga    2820
tgagttctcc cagtatttaa tactgtaagg gttgttggag acgacgacgt agataggccg    2880
ggtgtgtaag cgttgcgaga cgttgagcta accggtacta attgcccgag aggcttagcc    2940
atacaacgct caagtgtttt tggtagtgaa agttattacg gaataagtaa gtagtcaggg    3000
aatcggct                                                            3008
```

Fig.3

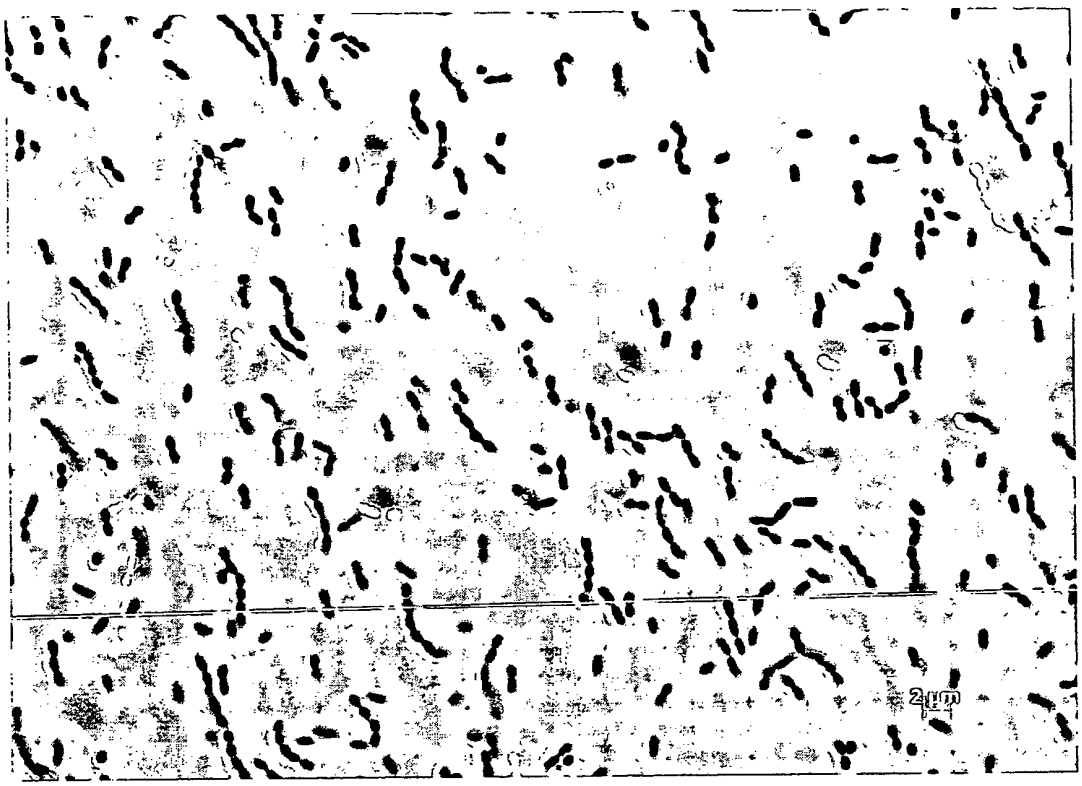


Fig.4

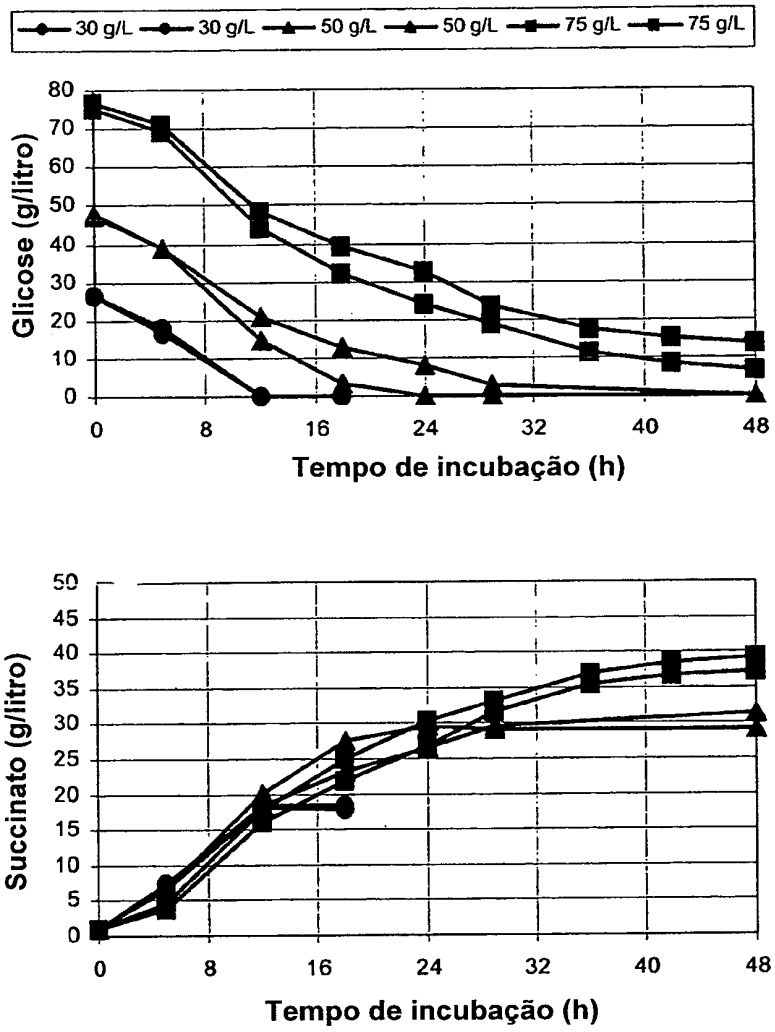

30 g/L
30 g/L
50 g/L
50 g/L
75 g/L
75 g/L
Glicose (g/litro)
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
8
16
24
32
40
48
Tempo de incubação (h)
Succinato (g/litro)
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
0
8
16
24
32
40
48
Tempo de incubação (h)

Fig.5

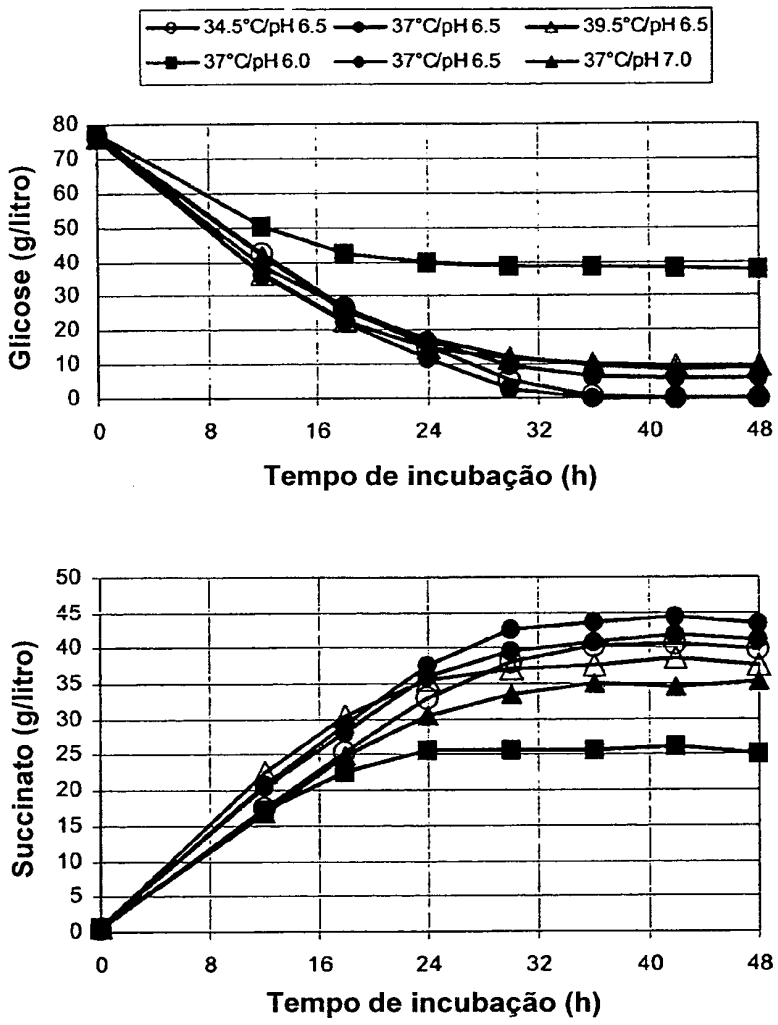

34.5°C/pH 6.5
37°C/pH 6.5
39.5°C/pH 6.5
37°C/pH 6.0
37°C/pH 6.5
37°C/pH 7.0
Glicose (g/litro)
Tempo de incubação (h)
Succinato (g/litro)
Tempo de incubação (h)

Fig.6

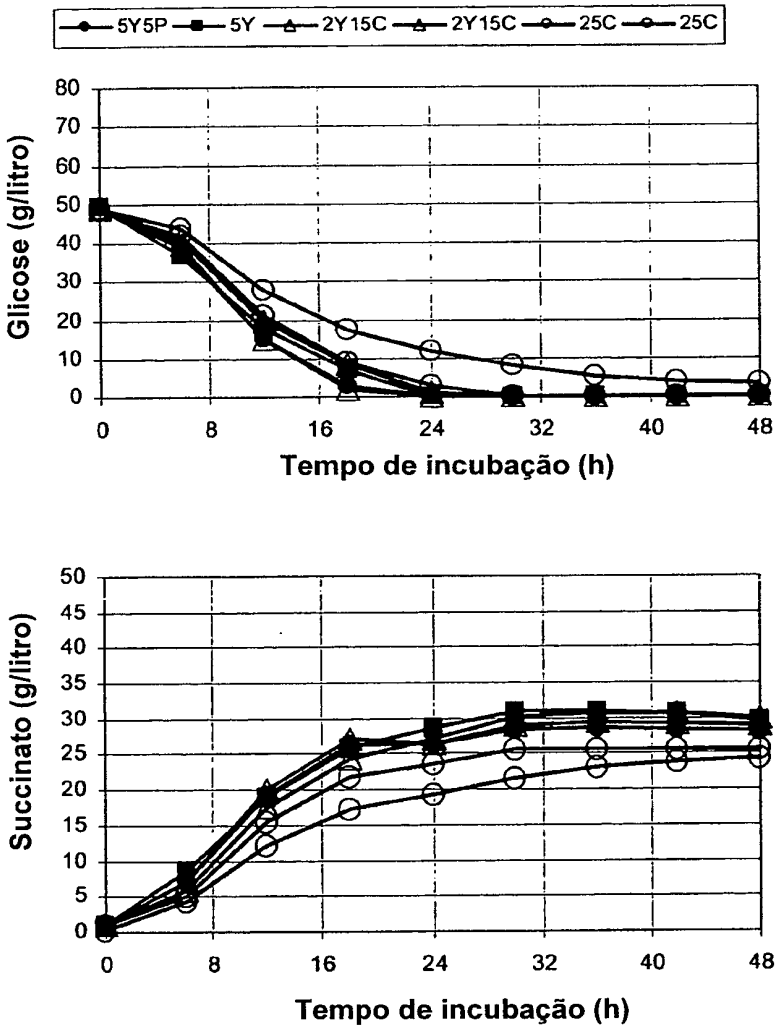

5Y5P
5Y
2Y15C
2Y15C
25C
25C
Glicose (g/litro)
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
8
16
24
32
40
48
Tempo de incubação (h)
Succinato (g/litro)
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
0
8
16
24
32
40
48
Tempo de incubação (h)

Fig.7

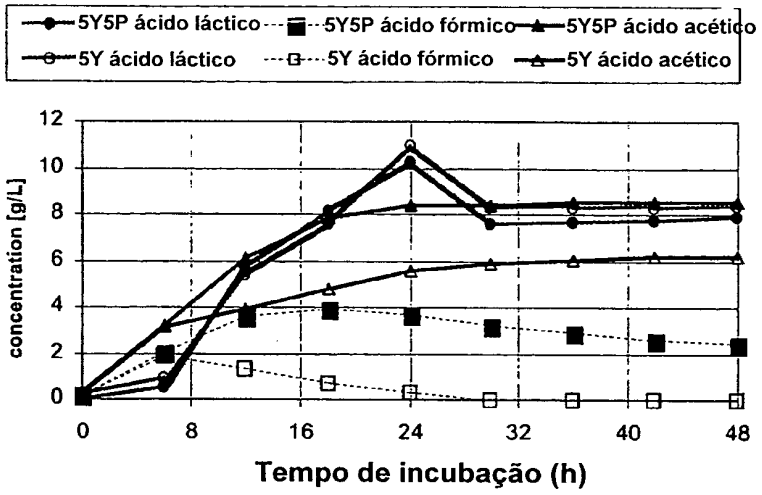

5Y5P ácido láctico
5Y5P ácido fórmico
5Y5P ácido acético
5Y ácido láctico
5Y ácido fórmico
5Y ácido acético
concentration [g/L]
0
2
4
6
8
10
12
0
8
16
24
32
40
48
Tempo de incubação (h)

Fig.8

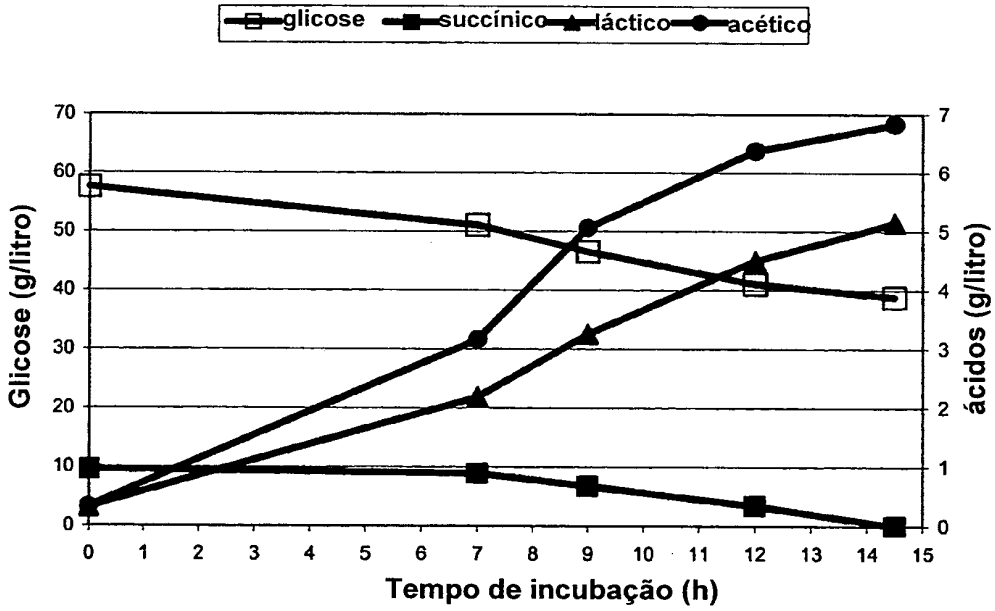

glicose
succínico
láctico
acético
Glicose (g/litro)
ácidos (g/litro)
0
10
20
30
40
50
60
70
0
1
2
3
4
5
6
7
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
Tempo de incubação (h)

Fig.9

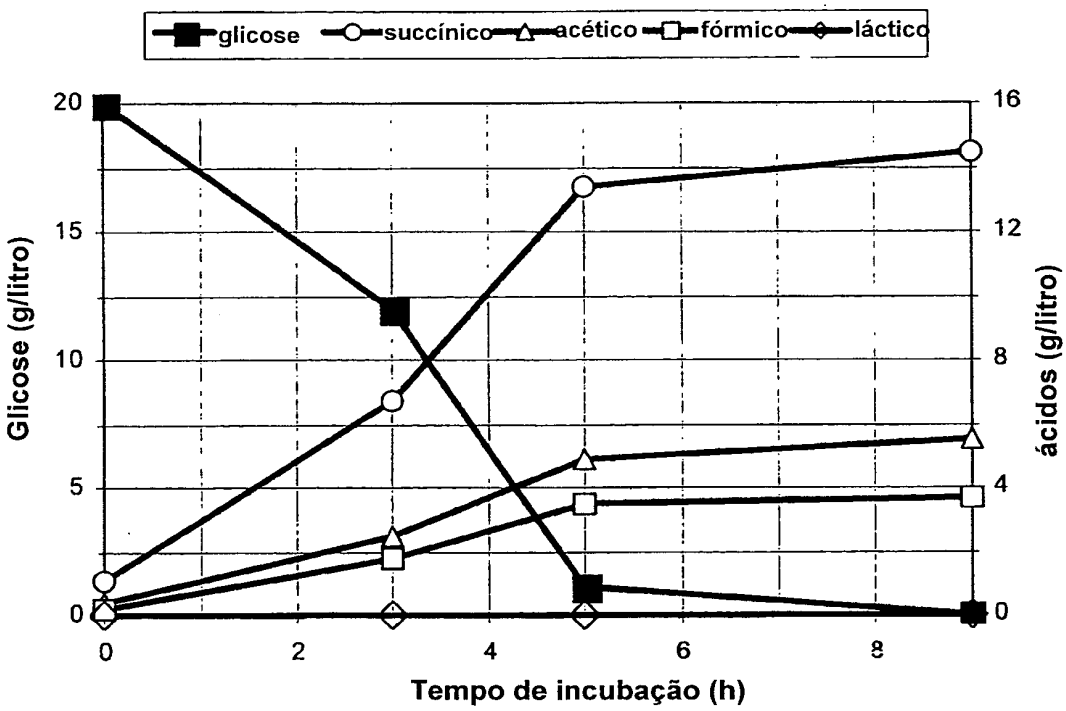

glicose
succínico
acético
fórmico
láctico
Glicose (g/litro)
ácidos (g/litro)
Tempo de incubação (h)
0
5
10
15
20
0
4
8
12
16
0
2
4
6
8

Fig.10