(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 764 410**

(51) Int. CI.:

C12N 1/32 (2006.01)
C12R 1/01 (2006.01)
C12P 7/46 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.08.2008 E 12162854 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.10.2019 EP 2505637**

(54) Título: **Nuevo productor de ácido succínico microbiano**

(30) Prioridad:

17.08.2007 EP 07114574

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.06.2020

(73) Titular/es:

BASF SE (100.0%)
Carl-Bosch-Strasse 38
67056 Ludwigshafen am Rhein, DE

(72) Inventor/es:

SCHOLTEN, EDZARD;
DAEGELE, DIRK;
HAEFNER, STEFAN y
SCHROEDER, HARTWIG

(74) Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

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

DESCRIPCIÓN

Nuevo productor de ácido succínico microbiano

La presente invención se refiere a una nueva cepa mutante de cepa bacteriana denominada DD1, que tiene la capacidad de producir ácidos orgánicos, en particular ácido succínico (AS), que originalmente se aisló del rumen bovino, y es capaz de utilizar glicerol como una fuente de carbono; así como a procedimientos de producción de ácidos orgánicos, en particular ácido succínico utilizando dicho microorganismo.

Técnica antecedente

La producción fermentativa de ácido succínico (AS) a partir de biomasa ya ha atraído una gran atención debido a que dicho ácido representa un constituyente importante de las resinas sintéticas o es una fuente de compuestos químicos valiosos de bajo peso molecular adicionales, en particular tetrahidrofurano (THF), 1,4-butanodiol (BDO), gamma-butirolactona (GBL) y pirrolidonas (documento WO-A-2006/066839).

Se describió una bacteria productora de AS del rumen bovino por Lee y col., (2002a). La bacteria es un bacilo o un cocobacilo gramnegativo no móvil, no formador de esporas, mesófilo y capnófilo. El análisis filogenético basado en la secuencia del ARNr 16S y el análisis fisiológico determinó que la cepa pertenece al género Mannheimia, como una nueva especie, y se ha denominado Mannheimia succiniciproducens MBEL55E. En condiciones de CO_2 al 100 %, crece bien en el intervalo de pH de 6,0-7,5 y produce ácido succínico, ácido acético y ácido fórmico en una proporción constante de 2:1:1. Cuando se cultivó M. succiniciproducens MBEL55E en condiciones anaerobias con saturación de CO_2 con glucosa como fuente de carbono, se consumieron 19,8 g/l de glucosa y se produjeron 13,3 g/l de AS en 7,5 h de incubación.

Un inconveniente significativo de dicho organismo es, sin embargo, su incapacidad para metabolizar el glicerol, que, como constituyente de los triacil gliceroles (TAG), pasa a estar fácilmente disponible, por ejemplo, como subproducto en la reacción de transesterificación de la producción de biodiésel (Dharmadi y col., 2006).

La producción fermentativa de ácido succínico a partir de glicerol se ha descrito en la bibliografía científica (Lee y col., 2001; Dharmadi y col., 2006) y se logró con mayores rendimientos de glicerol [masa de AS producida/masa de materia prima consumida] que con azúcares comunes, tales como la glucosa (Lee y col., 2001). Sin embargo, el rendimiento espacio-temporal obtenido con el glicerol fue sustancialmente menor que con la glucosa (0,14 frente a 1,0 g de AS/[l*h) y no se usó glicerol en bruto.

Solo en unos pocos casos, se ha descrito la metabolización anaerobia del glicerol en productos de fermentación. *E. coli* es capaz de fermentar el glicerol en condiciones muy específicas, tales como pH ácido, evitando la acumulación del hidrógeno gaseoso de fermentación, y una composición adecuada del medio. (Dharmadi y col., 2006, Yazdani y González 2007). Muchos microorganismos son capaces de metabolizar el glicerol en presencia de aceptores de electrones externos (metabolismo respiratorio), pocos son capaces de hacerlo de manera fermentativa (es decir, en ausencia de aceptores de electrones). Se ha estudiado en gran detalle el metabolismo fermentativo del glicerol en varias especies de la familia Enterobacteriaceae, tal como *Citrobacter freundii* y *Klebsiella pneumoniae.* La desasimilación de glicerol en estos organismos está estrictamente relacionada con su capacidad para sintetizar el producto altamente reducido 1,3-propanodiol (1,3-PDO) (Dharmadi y col., 2006). Se ha descrito la conversión de glicerol en ácido succínico usando *Anaerobiospirillum succiniciproducens* (Lee y col. 2001). Este estudio demostró que podría producirse ácido succínico con poca formación del subproducto ácido acético usando glicerol como fuente de carbono, facilitando de este modo la purificación del ácido succínico. Se obtuvo el rendimiento más alto añadiendo de manera intermitente glicerol y extracto de levadura, una estrategia que dio como resultado la producción de aproximadamente 19 g/l de ácido succínico. Se destacó, sin embargo, que se necesitaban componentes nutricionales no identificados presentes en el extracto de levadura para que se produjese la fermentación del glicerol.

Las reacciones de carboxilación de oxaloacetato catalizadas por las enzimas fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC), fosfoenolpiruvato carboxicinasa (PEPCK) y piruvato carboxilasa (PycA) utilizan HCO_3^- como fuente de CO_2 (Peters-Wendisch, PG et al). Por lo tanto, pueden aplicarse fuentes de hidrógenocarbonato, tales como $NaHCO_3$, $KHCO_3$, NH_4HCO_3 etc. a los medios de cultivo para mejorar la disponibilidad de HCO_3^- en las metabolizaciones de sustratos a ácido succínico. Hasta ahora no se ha observado en la técnica anterior que la producción de ácido succínico a partir de glucosa sea dependiente de la adición de HCO_3^-.

La producción de biomasa por organismos anaerobios está limitada por la cantidad de ATP producido a partir de las rutas fermentativas. El rendimiento de biomasa de glicerol en los organismos anaerobios es menor que el de los sacáridos, tales como hexosas como glucosa, fructosa, pentosas, tales como xilosa y arabinosa o disacáridos, tales como sacarosa o maltosa (Lee y col., 2001, Dharmadi y col., 2007).

Los sacáridos, sin embargo, pueden convertirse teóricamente en ácido succínico con un rendimiento significativamente menor que el glicerol debido al menor estado de reducción de los sacáridos en comparación con el poliol glicerol. Se ha observado que la combinación de sacáridos con glicerol funciona en organismos anaerobios productores de ácido succínico (Lee y col., 2001), sin embargo, sin alcanzar títulos de ácido succínico más allá de 28 g/l.

Existe, por lo tanto, una necesidad de cepas bacterianas adicionales, que tengan la capacidad de producir ácidos orgánicos, en particular AS, a partir de glicerol. En particular, dichas cepas deberían producir dichos ácidos con una alta productividad a partir de glicerol, específicamente si puede usarse glicerol en bruto, por ejemplo, a partir de la purificación de biodiésel sin purificación previa.

Sumario de la invención

Es un objeto de la presente invención proporcionar una cepa bacteriana que tenga la capacidad de producir ácido succínico a partir de glicerol, especialmente glicerol en bruto.

Dicho objeto fue resuelto por los presentes inventores que, sorprendentemente, aislaron una nueva cepa bacteriana, denominada DD1, que tiene la característica metabólica deseada.

Breve descripción de las figuras

Figura 1 muestra el árbol filogenético de DD1
Figura 2 muestra la secuencia del ADNr 16S (SEQ ID NO: 1) de DD1
Figura 3 muestra la secuencia del ADNr 23S (SEQ ID NO: 2) de DD1; su alineamiento con las seis secuencias individuales correspondientes de "M. succiniciproducens" MBEL55E; en la que las diferencias entre la secuencia de DD1 (parte inferior) y las secuencias de MBEL55E están destacadas, se muestra aparte en el Anexo 1;
Figura 4 muestra una imagen al microscopio óptico de DD1
Figura 5 muestra cultivos del lote de DD1 controlados con NH_4OH con diferentes concentraciones iniciales de glucosa
Figura 6 muestra cultivos del lote de DD1 controlados con NH_4OH con diferentes valores de temperatura y pH.
Figura 7 muestra cultivos del lote de DD1 controlados con NH_4OH. Las figuras representan los niveles iniciales [g/l] de extracto de levadura (Y), peptona (P) y extracto soluble de maíz (C).
Figura 8 muestra subproductos obtenidos en cultivos discontinuos de DD1 controlados con NH_4OH con y sin peptona.
Figura 9 muestra los resultados de cultivos discontinuos anaerobios de DD1 con glucosa como fuente de C.
Figura 10 muestra los resultados de un cultivo discontinuo anaerobio de DD1 en condiciones de saturación de CO_2 con glucosa como se describe por Lee y col., 2002a y 2002b.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a una cepa mutante de cepa bacteriana denominada DD1, que puede aislarse del rumen bovino, y es capaz de utilizar glicerol (incluyendo glicerol en bruto) como fuente de carbono.

La cepa mutante de la invención tiene la capacidad de producir ácido succínico a partir de glicerol (incluyendo glicerol en bruto), en particular, en condiciones anaerobias y tiene un ADNr 16S de SEQ ID NO: 1 o una secuencia que muestra una homología de secuencia de al menos el 99,9 %.

En una realización, la cepa mutante tiene un ADNr 23S de SEQ ID NO: 2 o una secuencia que muestra una homología de secuencia de al menos el 95, 96, 97, 98, 99 o 99,9 %.

"Identidad" u "homología" entre dos secuencias de nucleótidos significa identidad de los restos a lo largo de la longitud completa de las secuencias alineadas, tales como, por ejemplo, la identidad calculada (para secuencias bastante similares) con la ayuda del programa *needle* del paquete de programas bioinformáticos EMBOSS (Versión 5.0.0, http://emboss.source- forge.net/what/) con los parámetros por defecto que son:

- apertura de hueco (penalización por hueco abierto): 10,0
- extensión de hueco (penalización por hueco extendido): 0,5
- archivo de datos (archivo de matriz de puntuación incluido en el paquete): EDNAFUL

En el Anexo 1 se muestra un alineamiento de la secuencia del ADNr 23S de la cepa DD1 con las seis secuencias correspondientes individuales de "M. succiniciproducens" MBEL55E. En este, están resaltadas las diferencias entre la secuencia de DD1 (parte inferior) y las seis secuencias del ADNr 23S de MBEL55E. La secuencia de DD1 (véase también la SEQ ID NO: 2) representa la información de secuencia obtenida mediante secuenciación del ADNr 23S amplificado por PCR de DD1. Los experimentos de secuenciación dieron como resultado una información de secuencia inequívoca que indicaba que puede usarse la información de secuencia del ADNr 23S derivable de DD1 como característica distintiva de la cepa DD1. Dicha secuencia de DD1 difiere en al menos 6 posiciones de secuencia respecto de cada secuencia individual de MBEL55E. La diferencia más significativa es una inserción de aproximadamente 133 pb en cada una de las secuencias de MBEL55E (próxima a la posición 1325), que está ausente en la secuencia de DD1. Otras diferencias de secuencia específicas significativas, se encuentran en las posiciones 451, 1741, 2040, 2041, 2045 y 2492 (numeración como la usada en el alineamiento).
La cepa de la presente invención muestra también preferentemente al menos una de las siguientes características metabólicas adicionales:

a) producción de ácido succínico a partir de sacarosa; en particular, en condiciones anaerobias;
b) producción de ácido succínico a partir de maltosa; en particular, en condiciones anaerobias;
c) producción de ácido succínico a partir de D-fructosa; en particular, en condiciones anaerobias;
d) producción de ácido succínico a partir de D-galactosa; en particular, en condiciones anaerobias;
e) producción de ácido succínico a partir de D-manosa; en particular, en condiciones anaerobias;
f) producción de ácido succínico a partir de D-glucosa; en particular, en condiciones anaerobias;
g) producción de ácido succínico a partir de D-xilosa; en particular, en condiciones anaerobias;
h) producción de ácido succínico a partir de L-arabinosa; en particular, en condiciones anaerobias;
i) ninguna utilización de xilitol, inositol y sorbitol;
j) crecimiento tanto en condiciones aerobias como anaerobias;
k) crecimiento con concentraciones iniciales de glucosa de 75 g/l o más;
l) tolerancia al amoníaco.

En particular, dicha cepa muestra al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o todas de dichas características adicionales.

DD1 se analizó, por ejemplo, adicionalmente para determinar la capacidad para cometabolizar un sacárido y el poliol glicerol. Se observó que DD1 es capaz de metabolizar conjuntamente maltosa y glicerol, dando como resultado la formación de biomasa, la formación de ácido succínico y la utilización simultánea de maltosa y glicerol.
El término "ácido" (en el contexto de los ácidos orgánicos mono o dicarboxílicos, tal como se citan en el presente documento, p. ej., ácido acético, láctico y succínico) tiene que entenderse en su sentido más amplio y también abarca sales del mismo, como, por ejemplo, sales de metales alcalinos, como sales de Na y K, o sales alcalinotérreas, como sales de Mg y Ca, o sales de amonio; o anhídridos de dichos ácidos.

La expresión "glicerol en bruto" debe entenderse como una corriente que contiene glicerol no tratado tal como se obtiene en procedimientos en los que el glicerol es un subproducto, tales como, por ejemplo, la producción de biodiésel o de bioetanol. A menos que se afirme lo contrario, el término "glicerol", tal como se usa en el presente documento también abarca "glicerol en bruto".

En una realización preferida, la invención se refiere a una cepa mutante de la cepa bacteriana DD1 depositada en el DSMZ y que tiene el número de depósito DSM 18541. Dichos mutantes retienen al menos dicha capacidad para producir ácido succínico (AS) a partir de glicerol, sacarosa, maltosa, D-glucosa, D-fructosa y/o D-xilosa. En particular, también pueden tener ADNr 16S de SEQ ID NO: 1 o una secuencia que muestra una homología de secuencia de al menos el 99,9 % y también pueden tener un ADNr 23S de SEQ ID NO: 2 o una secuencia que muestra una homología de secuencia de al menos el 95, 96, 97, 98, 99 o 99,9 %. Las variantes (que no forman parte de la presente invención) o mutantes de dicha cepa DD1 pueden tener un ADNr 23S diferente de aquel de la SEQ ID NO: 2, a la vez que mantienen al menos una de las diferencias de secuencia descritas anteriormente que distingue a la secuencia del ADNr 23S de la de la cepa MBEL55E. Como, por ejemplo, la inserción de 132 pb también está ausente en dichas variantes o mutantes, combinada opcionalmente con una o más de las otras diferencias de secuencia específicas ilustradas en el alineamiento del Anexo 1.

De acuerdo con otra realización, la cepa bacteriana de la invención convierte al menos una fuente de carbono seleccionada entre sacarosa, maltosa, D-fructosa, D-glucosa, D-xilosa, L-arabinosa, D-galactosa, D-manosa y/o glicerol en ácido succínico con un coeficiente de rendimiento YP/S de al menos 0,5 g/g hasta aproximadamente 1,28 g/g; como por ejemplo un coeficiente de rendimiento YP/S de al menos 0,6 g/g, de al menos 0,7 g/g, de al menos 0,75 g/g, de al menos 0,8 g/g, de al menos 0,85 g/g, de al menos 0,9 g/g, de al menos 0,95 g/g, de al menos 1,0 g/g, de al menos 1,05 g/g, de al menos 1,1 g/g, de al menos 1,15 g/g, de al menos 1,20 g/g, de al menos 1,22 g/g, o de al menos 1,24 g/g

De acuerdo con otra realización más la cepa bacteriana de la invención convierte al menos 28 g/l de glicerol en al menos 28,1 g/l de ácido succínico, con un coeficiente de rendimiento YP/S de al menos 1,0 g/g, o de >1,0 g/g, o de >1,05 g/g, o de >1,1 g/g, o de >1,15 g/g, o de >1,20 g/g, o de >1,22 g/g, o de >1,24 g/g, hasta aproximadamente 1,28 g. Por ejemplo, 28 g/l de glicerol se pueden convertir hasta en aproximadamente 40 o hasta aproximadamente 35 g/l de ácido succínico.

De acuerdo con otra realización más la cepa bacteriana de la invención convierte al menos una fuente de carbono seleccionada de sacarosa, maltosa, D-fructosa, D-glucosa, D-xilosa, L-arabinosa, D-galactosa, D-manosa, y/o glicerol en ácido succínico con un rendimiento de productividad específica de al menos 0,6 g g DCW^{-1} h^{-1} de ácido succínico, o de al menos 0,65, de al menos 0,7 g g DCW^{-1} h^{-1}, de al menos 0,75 g g DCW^{-1} h^{-1}, o de al menos 0,77 g g DCW^{-1} h^{-1} de ácido succínico.

De acuerdo con otra realización más la cepa bacteriana de la invención convierte al menos una fuente de carbono seleccionada de sacarosa, maltosa, D-fructosa, D-glucosa, D-xilosa, L-arabinosa, D-galactosa, D-manosa, y/o glicerol en ácido succínico con un rendimiento espacio-temporal para el ácido succínico de al menos 2,2 g/(l h), o de al menos 2,5, al menos 2,75, al menos 3, al menos 3,25, al menos 3,5 o al menos 3,7 g/(l*h) de ácido succínico.

De acuerdo con otra realización más la cepa bacteriana de la invención convierte al menos 28 g/l de al menos una fuente de carbono seleccionada de sacarosa, maltosa, D-fructosa, D-glucosa, D-xilosa, L-arabinosa, D-galactosa, D-

manosa, y/o glicerol en ácido succínico con un rendimiento espacio-temporal para el ácido succínico de al menos 2,2 g/l h), o de al menos 2,5, al menos 2,75, al menos 3, al menos 3,25, al menos 3,5 o al menos 3,7 g/(l*h).

De acuerdo con otra realización, la cepa bacteriana de la invención convierte al menos una fuente de carbono seleccionada entre sacarosa, maltosa, D-fructosa, D-glucosa, D-xilosa, L-arabinosa, D-galactosa, D-manosa, y/o glicerol en ácido succínico con un rendimiento de productividad específica de al menos 0,6 g g DCW^{-1} h^{-1} o de al menos 0,65 o de al menos 0,7 g g DCW^{-1} h^{-1} de ácido succínico, o de al menos 0,77 g g DCW^{-1} h^{-1} de ácido succínico y un rendimiento espacio-temporal para el ácido succínico de al menos 2,2 g/(l h), o de al menos 2,5, al menos 2,75, al menos 3, al menos 3,25, al menos 3,5 o al menos 3,7 g/(l*h).

En otra realización de las cepas bacterianas reivindicadas como se ha definido anteriormente, la fuente de carbono es glicerol o una mezcla de glicerol y al menos otra fuente de carbono seleccionada de sacarosa, maltosa, D-fructosa, D-galactosa, D-manosa, D-glucosa, D-xilosa, y L-arabinosa.

Los diferentes parámetros de rendimiento tal como se describen en el presente documento ("Rendimiento" o YP/S; "rendimiento de productividad específica"; o rendimiento espacio-temporal (STY)) son bien conocidos en la técnica y se determinan como se describe por ejemplo por Song y Lee, 2006.

"Rendimiento" e "YP/S" (cada uno expresado en masa de producto producida/masa de material consumida) se usan en el presente documento como sinónimos.

El rendimiento de productividad específica describe la cantidad de un producto, tal como ácido succínico, que se produce por h y l de caldo de fermentación por g de biomasa seca. La cantidad de peso celular seco indicada como DCW describe la cantidad de microorganismos biológicamente activos en una reacción bioquímica. El valor se proporciona como g de producto por g de DCW por h (es decir, g g DCW^{-1} h^{-1}).

Una realización adicional de la invención se refiere a un procedimiento para la producción fermentativa de un ácido orgánico o una sal o derivado del mismo, procedimiento que comprende las etapas de:

a) incubar una cepa bacteriana como se ha definido en una de las reivindicaciones precedentes en un medio que contiene una fuente de carbono asimilable y cultivar dicha cepa a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 10 a 60 o de 20 a 50 o de 30 a 45 °C a un pH de 5,0 a 9,0 o de 5,5 a 8,0 o de 6,0 a 7,0 en presencia de dióxido de carbono; y
b) obtener dicho ácido orgánico o sal o derivado del mismo del medio.

Dicho procedimiento puede llevarse a cabo de manera discontinua o continua y puede controlarse el transcurso de la producción de ácido por medios convencionales, tales como, por ejemplo, análisis HPLC o GC.

Preferentemente, se produce ácido succínico (AS) mediante dicho procedimiento, preferentemente en condiciones anaerobias. Las condiciones anaerobias pueden establecerse mediante técnicas convencionales, tales como, por ejemplo, desgasificando los constituyentes del medio de reacción y manteniendo condiciones anaerobias introduciendo dióxido de carbono o de nitrógeno o mezclas de los mismos y opcionalmente hidrógeno a un caudal de, por ejemplo, de 0,1 a 1 o de 0,2 a 0,5 vvm.

Las condiciones aerobias pueden establecerse mediante técnicas convencionales, como por ejemplo introduciendo aire u oxígeno a un caudal de, por ejemplo, de 0,1 a 1 o de 0,2 a 0,5 vvm.

En caso adecuado, puede aplicarse una ligera sobrepresión de 0,1 a 1,5 bar.

En dicho procedimiento, dicha fuente de carbono asimilable se selecciona preferentemente entre glicerol, D-glucosa, D-xilosa, L-arabinosa, D-galactosa, y mezclas de los mismos o composiciones que contienen al menos uno de dichos compuestos, o se selecciona entre los productos de descomposición del almidón, celulosa, hemicelulosa y/o lignocelulosa.

La concentración inicial de la fuente de carbono asimilable se ajusta preferentemente a un valor en el intervalo de 5 a 100 g/l y puede mantenerse en dicho intervalo durante el cultivo.

El pH del medio de reacción se puede controlar por adición de bases adecuadas como por ejemplo, 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, $CH_3N_2O_2$, C_2H_7N, u otras bases y mezclas de las mismas. El estado físico de la base puede ser una solución acuosa, suspensión acuosa, gaseosa o sólida.

Las condiciones particularmente preferidas para producir AS son:

Fuente de carbono: Glucosa, xilosa o maltosa y/o glicerol (incluyendo glicerol en bruto) Temperatura: de 30 a 45 °C pH: de 6,0 a 7,0, controlada con una base como se ha descrito anteriormente, preferentemente con una fuente de HCO_3^- tal como Na_2CO_3, $NaHCO_3$, $Mg(HCO_3)_2$, $Ca(HCO_3)_2$ o, $Mg(OH)_2$, $MgCO_3$, $Ca(OH)_2$, $CaCO_3$. gas suministrado: CO_2

En otra realización, la presente invención proporciona un procedimiento para la producción fermentativa de ácido succínico o de una sal o derivado del mismo, procedimiento que comprende las etapas de:

a) incubar una cepa bacteriana en un medio que contiene al menos una fuente de carbono asimilable y cultivar dicha cepa en condiciones que favorecen la formación del ácido orgánico deseado;
b) obtener dicho ácido orgánico o sal o derivado del mismo del medio;

procedimiento que se caracteriza adicionalmente por la conversión de al menos 28 g/l de glicerol a al menos 28,1 g/l de ácido succínico, con un coeficiente de rendimiento YP/S de al menos 1,0 g/g, o de >1,0 g/g, o de > 1,05 g/g, o de >1,1 g/g, o de >1,15 g/g, o de >1,20 g/g, o de >1,22 g/g, o de >1,24 g/g; hasta aproximadamente 1,28 g; como por ejemplo un coeficiente de rendimiento YP/S de al menos 0,6 g/g, de al menos 0,7 g/g, de al menos 0,75 g/g, de al menos 0,8 g/g, de al menos 0,85 g/g, de al menos 0,9 g/g, de al menos 0,95 g/g, de al menos 1,0 g/g, de al menos 1,05 g/g, de al menos 1,1 g/g, de al menos 1,15 g/g, de al menos 1,20 g/g, de al menos 1,22 g/g, o de al menos 1,24 g/g. Por ejemplo, 28 g/l de glicerol se pueden convertir hasta en aproximadamente 40 o hasta aproximadamente 35 g/l de ácido succínico.

En otra realización, la presente invención proporciona un procedimiento para la producción fermentativa de ácido succínico o de una sal o derivado del mismo, procedimiento que comprende las etapas de:

a) incubar una cepa bacteriana en un medio que contiene al menos una fuente de carbono asimilable y cultivar dicha cepa en condiciones que favorecen la formación del ácido orgánico deseado;
b) obtener dicho ácido orgánico o sal o derivado del mismo del medio; procedimiento que se caracteriza adicionalmente por

la conversión de una fuente de carbono seleccionada de sacarosa, maltosa, D-fructosa, D-glucosa, D-xilosa, L-arabinosa, D-galactosa, D-manosa, y/o glicerol en ácido succínico con un rendimiento de productividad específica de al menos 0,6 g g DCW^{-1} h^{-1} de ácido succínico o de al menos 0,65 o de al menos 0,7 g g DCW^{-1} h^{-1} de ácido succínico o de al menos 0,75 g g DCW^{-1} h^{-1} de ácido succínico o de al menos 0,77 g g DCW^{-1} h^{-1} de ácido succínico.

En otra realización, la presente invención proporciona un procedimiento para la producción fermentativa de ácido succínico o de una sal o derivado del mismo, procedimiento que comprende las etapas de:

a) incubar una cepa bacteriana en un medio que contiene al menos una fuente de carbono asimilable y cultivar dicha cepa en condiciones que favorecen la formación del ácido orgánico deseado;
b) obtener dicho ácido orgánico o sal o derivado del mismo del medio;

procedimiento que se caracteriza adicionalmente por la conversión de una fuente de carbono seleccionada de sacarosa, maltosa, D-fructosa, D-glucosa, D-xilosa, L-arabinosa, D-galactosa, D-manosa, y/o glicerol en ácido succínico con un rendimiento espacio-temporal para el ácido succínico de al menos 2,2 g/l h), o de al menos 2,5, al menos 2,75, al menos 3, al menos 3,25, al menos 3,5 o al menos 3,7 g/(l*h) de ácido succínico.

En otra realización, la presente invención proporciona un procedimiento para la producción fermentativa de ácido succínico o de una sal o derivado del mismo, procedimiento que comprende las etapas de:

a) incubar una cepa bacteriana en un medio que contiene al menos una fuente de carbono asimilable y cultivar dicha cepa en condiciones que favorecen la formación del ácido orgánico deseado;
b) obtener dicho ácido orgánico o sal o derivado del mismo del medio;

procedimiento que se caracteriza adicionalmente por la conversión de al menos 28 g/l de una fuente de carbono seleccionada de sacarosa, maltosa, D-fructosa, D-glucosa, D-xilosa, L-arabinosa, D-galactosa, D-manosa, y/o glicerol en ácido succínico con un rendimiento espacio-temporal para el ácido succínico de al menos 2,2 g/l h), o de al menos 2,5, al menos 2,75, al menos 3, al menos 3,25, al menos 3,5 o al menos 3,7 g/(l*h).

En otra realización, la presente invención proporciona un procedimiento para la producción fermentativa de ácido succínico o de una sal o derivado del mismo, procedimiento que comprende las etapas de:

a) incubar una cepa bacteriana en un medio que contiene al menos una fuente de carbono asimilable y cultivar dicha cepa en condiciones que favorecen la formación del ácido orgánico deseado;
b) obtener dicho ácido orgánico o sal o derivado del mismo del medio;

procedimiento que se caracteriza adicionalmente por la conversión de una fuente de carbono seleccionada de sacarosa, maltosa, D-fructosa, D-glucosa, D-xilosa, L-arabinosa, D-galactosa, D-manosa y/o glicerol en ácido succínico con un rendimiento de productividad específica de al menos 0,6 g g DCW^{-1} h^{-1} de ácido succínico o de al menos 0,65 o de al menos 0,7 g g DCW^{-1} h^{-1} de ácido succínico o de al menos 0,75 g g DCW^{-1} h^{-1} de ácido succínico o de al menos 0,77 g g DCW^{-1} h^{-1} de ácido succínico y un rendimiento espacio-temporal para el ácido succínico de al menos 2,2 g/(l h), o de al menos 2,5, al menos 2,75, al menos 3, al menos 3,25, al menos 3,5 o al menos 3,7 g/(l*h).

En otra realización de los procedimientos de producción de ácido succínico anteriormente identificados, la fuente de

carbono es glicerol o una mezcla de glicerol y al menos otra fuente de carbono seleccionada de sacarosa, maltosa, D-fructosa, D-galactosa, D-manosa, D-glucosa, D-xilosa, y L-arabinosa.

Las condiciones preferidas adecuadas se derivarán de los ejemplos y figuras adjuntos.

El ácido succínico y/o las sales de ácido succínico producidas pueden aislarse de manera convencional mediante procedimientos conocidos en la técnica, como por ejemplo cristalización, filtración, electrodiálisis, cromatografía. Por ejemplo, pueden aislarse precipitando como producto de succinato de calcio en el fermentador durante la fermentación usando hidróxido, óxido, carbonato o hidrógenocarbonato de calcio para la neutralización y filtración del precipitado.

El producto de ácido succínico deseado se recupera a partir del calcio o succinato precipitado mediante acidificación del succinato con ácido sulfúrico seguido de filtración para eliminar el sulfato de calcio (yeso) o que precipita. La solución resultante puede purificarse adicionalmente mediante cromatografía de intercambio iónico para eliminar los iones residuales no deseados.

Otra realización de la invención se refiere a un procedimiento para la producción de ácido succínico y/o sales de ácido succínico, en particular sales de amonio, procedimiento que comprende la producción fermentativa de ácido succínico, tal como se define anteriormente y controlando el pH con una base adecuada, en particular una base inorgánica, como amoniaco, o una solución acuosa de la misma.

Otra realización de la invención se refiere a un procedimiento para la producción de tetrahidrofurano (THF) y/o 1,4-butanodiol (BDO) y/o gamma-butirolactona (GBL) que comprende

a) la producción fermentativa de ácido succínico y/o sales de ácido succínico, por ejemplo, sales de amonio, tal como se definen anteriormente, y
b1) bien la hidrogenación catalítica directa del ácido libre obtenido en THF y/o BDO y/o GBL o
b2) la esterificación química del ácido succínico libre obtenido y/o las sales de amonio del ácido succínico en su correspondiente éster de di-alquilo inferior y la posterior hidrogenación catalítica de dicho éster en THF y/o BDO y/o GBL.

Alquilo inferior representa preferentemente un resto alquilo C_1-C_6 de cadena lineal o ramificada, preferentemente C_1-C_4, en particular metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, sec-butilo, isobutilo, *terc*-butilo, así como n-pentilo y n-hexilo y análogos ramificados de los mismos.

Otra realización de la invención se refiere a un procedimiento para la producción de pirrolidonas que comprende

a) la producción fermentativa de sales de amonio de ácido succínico como se ha definido anteriormente, y
b) la conversión química de las sales de amonio de ácido succínico en pirrolidonas de la manera conocida per se, por ejemplo como se ha descrito en el documento WO-A-2006/066839.

En una realización preferida, dicho glicerol, que se usa como fuente de carbono asimilable, es glicerol en bruto.

Más detalles sobre la hidrogenación directa de AS:

Las condiciones experimentales adicionales para llevar a cabo la hidrogenación catalítica directa se conocen bien, y por ejemplo, se describen en el documento US 4.550.185,

EL AS se hidrogena de una manera conocida en sí usando procedimientos, aparatos y sustancias auxiliares, tales como disolventes, familiares para los expertos en la materia. En particular, se lleva a cabo una hidrogenación continua o por lotes de fase líquida en presencia de un catalizador heterogéneo adecuado para la hidrogenación ácida. Los parámetros óptimos del procedimiento pueden establecerse por el experto en la materia sin un esfuerzo inaceptable. Por ejemplo, la temperatura de reacción se encuentra dentro del intervalo de aproximadamente 100 a aproximadamente 300 °C, preferentemente en el intervalo de aproximadamente 130 a 285 °C, y la presión es de aproximadamente 20 a 350 bar, por ejemplo de 100 a 250 bar. Los catalizadores que se pueden usar para la reacción de hidrogenación son conocidos por el experto en la materia. Por ejemplo, se pueden usar varios catalizadores de paladio/renio/carbono. Los disolventes que se pueden utilizar para la reacción de hidrogenación con conocidos por el experto en la materia. Por ejemplo, se puede usar un medio disolvente acuoso.

Más detalles sobre la esterificación del AS seguida de hidrogenación:

Las condiciones experimentales adicionales para llevar a cabo la esterificación química, seguida de hidrogenación catalítica directa se conocen bien, y se describen, por ejemplo, en la Solicitud de Patente Europea 06007118,0.

a) Procedimiento de esterificación:

El procedimiento de esterificación que puede comprender una destilación reactiva puede llevarse a cabo usando un aparato conocido en sí con diversos diseños.

Por ejemplo, puede usarse una planta de esterificación que funciona de modo continuo la cual comprende una columna

de rectificación con un número adecuado de etapas teóricas logradas mediante la instalación de bandejas o empaquetamientos. La carga acuosa que comprende la sal de amonio de AS se alimenta en la parte superior de la columna a partir de un vaso de depósito tan pronto como se ha formado un perfil de temperatura de estado estacionario en la columna como resultado de la alimentación de alcanol que se evapora en el bucle de evaporador adyacente al sumidero de la columna. La reacción forma un flujo contracorriente de líquido descendente, que contiene sal de amonio y condensado, y una fase de vapor ascendente, que contiene alcanol. Para catalizar la reacción de esterificación, puede añadirse un catalizador homogéneo a la carga inicial de sal de amonio. Como alternativa, pueden proporcionarse los catalizadores heterogéneos en la parte interna de la columna. El éster carboxílico formado es líquido en las condiciones del procedimiento y pasa a través del extremo inferior de la columna al sumidero de la columna de destilación y se extrae de manera continua del sumidero. Los componentes gaseosos, por ejemplo, mezclas azeotrópicas que comprenden alcanol-agua y/o amoniaco, se extraen de la columna de reacción y por tanto se forma un equilibrio de reacción en la parte superior de la columna.

Pueden incorporarse modificaciones adicionales de las realizaciones específicas anteriormente descritas por los expertos en la materia sin un esfuerzo inaceptable.

Los intervalos adecuados para los parámetros del procedimiento para el procedimiento de esterificación de acuerdo con la invención pueden determinarse fácilmente por el experto en la materia dependiendo de la configuración del aparato usado, por ejemplo, el tipo de componentes internos de la columna usados, el tipo y la cantidad de los reactantes, el tipo y la cantidad del catalizador usado en caso adecuado. Por ejemplo, sin restringirse a los mismos, pueden ajustarse parámetros individuales dentro de los siguientes intervalos de parámetros:

Temperatura de la columna: 0-300 °C, en particular 40-250 °C, o 70-200 °C
Presión: de 0,1 a 6 bar, en particular a presión convencional
Tiempo de residencia: unos pocos segundos (por ejemplo de 1 a 60) hasta días (por ejemplo, de 1 a 5), en particular desde unos pocos minutos (por ejemplo, de 1 a 60) hasta unas pocas horas (por ejemplo, de 1 a 15), más preferentemente desde unos pocos minutos (por ejemplo, de 5 a 20) hasta 2 h.

b) Procedimiento de hidrogenación

Los ésteres de AS preparados de acuerdo con la invención se hidrogenan de un modo conocido en sí usando procedimientos, aparatos y sustancias auxiliares, tales como catalizadores, familiares para los expertos en la materia.

En particular, se lleva a cabo una hidrogenación continua o por lotes de fase gaseosa en presencia de un catalizador heterogéneo adecuado para la hidrogenación de ésteres. Los parámetros óptimos del procedimiento pueden establecerse por el experto en la materia para el éster en particular sin un esfuerzo inaceptable. Por ejemplo, la temperatura de reacción se encuentra dentro del intervalo de aproximadamente 100 a aproximadamente 300 °C, preferentemente en el intervalo de aproximadamente 200 a 280 °C, y la presión es de aproximadamente 5 a 100 bar, por ejemplo de 10 a 50 bar. La relación molar entre reactante e hidrógeno se ajusta dentro del intervalo de aproximadamente 1:100 a aproximadamente 1:2000, por ejemplo, de 1:800 a 1:1500.

Los catalizadores que se pueden utilizar para la reacción de hidrogenación de la invención con conocidos por el experto en la materia. Por ejemplo, se pueden usar varios catalizadores de cobre. La técnica anterior describe, por ejemplo, el uso de catalizadores de cromito de cobre reducidos que pueden obtenerse con el nombre 85/1 de Davy Process Technology Ltd., Inglaterra. Sin embargo, los catalizadores particularmente adecuados de acuerdo con la invención son catalizadores de óxido de cobre soportados, aplicándose el óxido de cobre a materiales de soporte de alúmina o sílice. Los ejemplos de la hidrogenación de ésteres succínicos a BDO (1,4-butanodiol)/GBL (gamma butirolactona)/THF con catalizadores de cobre también se describen en la siguiente tesis: Schlander, Jan., Feb. 2000, University of Karlsruhe, "Gasphasenhydrierung von Maleinsäuredimethylester zu 1,4-Butandiol, gamma-Butyrolacton und Tetrahydrofuran an Kupfer-Katalysatoren".

Más detalles sobre las etapas de fermentación:

Una fermentación, tal como se usa de acuerdo con la presente invención, puede llevarse a cabo en fermentadores agitados, columnas de burbujeo y reactores de bucle. Puede hallarse una descripción exhaustiva de los tipos de procedimiento posibles, incluyendo tipos de agitador y diseños geométricos en "Chmiel: Bioprozesstechnik: Einführung in die Bioverfahrenstechnik, Band 1". En el procedimiento, las variantes típicas disponibles son las siguientes variantes conocidas por los expertos en la materia o explicadas, por ejemplo, en "Chmiel, Hammes and Bailey: Biochemical Engineering", tales como la fermentación por lotes, lotes alimentados, lotes alimentados repetidos o continua con y sin reciclado de la biomasa. Dependiendo de la cepa de producción, burbujeando con aire, oxígeno, dióxido de carbono, hidrógeno, nitrógeno o mezclas adecuadas de gas pueden/tienen que efectuarse en orden para lograr buenos rendimientos.

Antes de la conversión química en el caldo de fermentación en el procedimiento de acuerdo con la invención, puede pretratarse el caldo de fermentación; por ejemplo, puede eliminarse la biomasa del caldo. Los procedimientos para eliminar la biomasa se conocen por los expertos en la materia, por ejemplo, filtración, sedimentación y flotación. Por consiguiente, puede retirarse la biomasa, por ejemplo, con centrifugadoras, separadores, decantadores, filtros o en aparatos de flotación. Para la máxima recuperación del producto de valor, a menudo es aconsejable el lavado de la

biomasa, por ejemplo, en forma de una diafiltración. La selección del procedimiento depende del contenido de biomasa en el caldo del fermentador y de las propiedades de la biomasa, y también de la interacción de la biomasa con el producto de valor. En una realización, puede esterilizarse o pasteurizarse el caldo de fermentación.

En una realización adicional, se concentra el caldo de fermentación. Dependiendo de las necesidades, esta concentración puede llevarse a cabo de manera por lotes o continua. El intervalo de presión y temperatura debe seleccionarse de tal forma que en primer lugar no se produce daño al producto, y en segundo lugar se necesita un uso mínimo del aparato y de energía. La selección experta de los niveles de presión y temperatura para una evaporación en múltiples etapas, en particular, permite ahorrar energía.

En cuanto a los aparatos, pueden usarse tanques agitados, evaporadores de película descendente, evaporadores de película fina, evaporadores ultrarrápidos de circulación forzada y otros tipos de evaporadores en un modo de circulación natural o forzada.

Por consiguiente, se entiende que la expresión "caldo de fermentación" significa una solución acuosa que se basa en un procedimiento fermentativo y que no se ha procesado o que se ha procesado, por ejemplo, tal como se describe en el presente documento.

La presente invención se describirá en más detalle mediante los siguientes ejemplos. Los siguientes ejemplos son con fines ilustrativos y no pretenden limitar el ámbito de la invención.

Ejemplo 1: Aislamiento de DD1

Para el aislamiento, se usó un enfoque en cuatro etapas, que comprende las etapas de recogida de muestras, cultivo de enriquecimiento, aislamiento de los cultivos puros y ensayo de los cultivos puros para la determinación de la producción de ácido succínico (AS).

1. Enfoque experimental

1.1. Recogida de muestras

Se tomaron muestras de rumen bovino, lodo digerido de una planta de aguas residuales municipal y pulpa, los residuos de la producción de vino. Los hábitats se caracterizan por concentraciones relativamente altas de sustancias orgánicas y una atmósfera rica en CO_2 sin oxígeno. A continuación, se proporciona información más detallada acerca de las muestras, su origen y manipulación.

a) Se extrajo contenido del rumen de una vaca Holstein canulada en el Institut für Tierernährung, Universidad de Hohenheim. El pH y la temperatura in situ fueron de 6,7 y 37 °C, respectivamente. El material se filtró a través de un filtro de tela estéril, se gaseó con CO_2 y se enfrió inmediatamente sobre hielo para el transporte y se procesó en el mismo día.
b) El lodo digerido se extrajo de la torre de digestión de la planta de aguas residuales municipal en Mannheim-Sandhofen. El pH y la temperatura in situ fueron de 7,1 y 36,3 °C, respectivamente. Las muestras se enfriaron sobre hielo y se procesaron el mismo día. Los componentes principales de la fase gaseosa en el lodo son metano y dióxido de carbono.
c) Las muestras de pulpa se recogieron en noviembre de 2005 de un campo en el sudeste de Alemania. Se recogió pulpa de uvas rojas (Spätburgunder) de la parte central de un depósito de gran tamaño. Esta zona debería ser anaerobia. Se recogió pulpa de uvas blancas (Müller-Thurgrau) de un depósito de almacenamiento en el que ya se estaba produciendo la fermentación alcohólica.

1.2. Cultivo de enriquecimiento

Se efectuaron cultivos de enriquecimiento en diferentes medios que contenían D-glucosa, D-xilosa y L-arabinosa como única fuente de carbono. La composición del medio es como se define a continuación:

Tabla 1: Composición del medio para cultivos de enriquecimiento.

Compuesto	**Concentración [g/l]**
Fuente de C[a]	15
Extracto de levadura 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 reductor)	0,24

(continuación)

Compuesto	Concentración [g/l]
$MgCO_3$[b]	15
Lasalocida[c]	16 mg/l
Monensina[c]	10 mg/l
Anfotericina B[d]	2,5 mg/l
Licor de rumen (opcional)[e]	5
Extracto de lodo digerido (opcional)[f]	10
Extracto de pulpa (opcional)[f]	10
Agar Bacto (solo para medios sólidos)	12

[a] D-glucosa, D-xilosa o L-arabinosa
[b] $MgCO_3$ (Riedel-de Haen, número de producto: 13117 de Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze, Alemania).
[c] Solución madre en etanol.
[d] Solución madre en dimetil sulfóxido
[e] El líquido del rumen se centrifugó. El sobrenadante se esterilizó por filtración, el filtrado estéril se añadió a los ensayos de enriquecimiento con el contenido del rumen como inóculo.
[f] se mezclaron 10 g de lodo digerido con 25 ml de agua destilada y se agitó intensamente durante 15 min. Las partículas grandes se separaron usando un paño de filtro. Las suspensiones se esterilizaron por filtración, los filtrados estériles se añadieron a los ensayos de enriquecimiento respectivos.

Se esterilizaron en autoclave $MgCO_3$ y agua (0,75 g y 40 mal) en frascos de suero de 100 ml (121 °C, 20 min). El extracto de levadura, la peptona, la fuente de C, el NH_4SO_4 y el K_2HPO_4 se esterilizaron por separado en autoclave. Para los cloruros de Ca, Mg y Na se preparó una solución madre que se esterilizó en autoclave. Para asegurarse que no hubiese oxígeno presente, se usaron los siguientes procedimientos convencionales:

- Los medios de cultivo se gasearon con CO_2 estéril y libre de oxígeno después la esterilización en autoclave.
- Se utilizó una caja anaerobia (Meintrup DWS Laborgerate GmbH, Lähden-Holte, Alemania) para los experimentos que habían de realizarse en condiciones anaerobias.
- La incubación de las placas de agar se produjo en frascos anaerobios. Para garantizar las condiciones anaerobias, se usó Anaerocult®A (Merck).

Las muestras de rumen y el lodo digerido se emplearon sin diluir como inóculo. Se diluyeron 50 g de pulpa sólida en 100 ml de solución de NaCl al 0,9 %, se filtró para eliminar las partículas grandes y después se usó como inóculo.

Se llenaron frascos de suero de 100 ml (Zscheile & Klinger, Hamburgo, Alemania) con 50 ml de medio y 2 ml del inóculo respectivo, se cerraron con tapones de caucho de butilo (Ochs GmbH, Bovenden/lenglern, Alemania) y se gasearon con CO_2. Se ajustó una sobrepresión de aproximadamente 0,8 bar. Los frascos se incubaron en un incubador agitado (160 rpm, diámetro de agitación: 2,5 cm) a 37 °C.

Se cuantificó el consumo de glucosa, xilosa y arabinosa y la formación de ácido succínico y de subproductos mediante análisis HPLC de los sobrenadantes sin células sin diluir del caldo de cultivo usando detección IR. Se extrajeron muestras del caldo con una jeringuilla estéril a través del tapón de caucho de butilo, la separación de las células se llevó a cabo mediante filtración (0,22 µm). Se usaron una columna Aminex HPX-87 H (Biorad) de 300 x 7,8 mm de D.I. y 5 mm de H_2SO4 como fase estacionaria y fase móvil, respectivamente. La temperatura de la columna fue de 30 °C, el caudal fue de 0,5 ml min^{-1}.

1.3. Aislamiento de cultivos puros

El aislamiento de los cultivos puros de los cultivos de enriquecimiento se logró mediante siembra repetida en placas de agar.

1.4. Ensayo de cultivos puros para determinar la producción de ácido succínico

Se ensayaron los cultivos puros en cultivo líquido para determinar la producción de AS. Se cuantificó el consumo de azúcar y la formación de AS y productos secundarios mediante HPLC. Las condiciones de cultivo y de HPLC fueron las mismas que las descritas en la sección anterior "Cultivo de enriquecimiento".

2. Resultados

2.1. Condiciones de enriquecimiento recomendadas

La siguiente tabla resume aquellas condiciones experimentales, que son recomendables para el enriquecimiento de productores de ácido succínico (AS).

Tabla 2: Condiciones experimentales recomendadas para la producción de productores de AS.

	Contenido del rumen	Lodo digerido	Pulpa
Fuente de C	L-arabinosa	L-arabinosa[a]	D-glucosa, L-arabinosa
Tampón	$MgCO_3$	$MgCO_3$	$MgCO_3$
Antibióticos	lasalocida, monensina	lasalocida, monensina	anfotericina B
Tiempo de incubación	< 16 h	< 24 h	< 50 h

[a] la glucosa y la xilosa no se ensayaron en ensayos con lodo digerido.

Para el enriquecimiento de productores de AS del contenido del rumen, la mejor fuente de C es la arabinosa (3/3 cultivos de enriquecimiento que muestran producción de AS, 0/3 con glucosa, 2/3 con xilosa). Los resultados se resumen en la siguiente tabla. La adición de los antibióticos ionóforos lasalocida y monensina al medio de enriquecimiento dio como resultado una producción de AS sustancialmente mayor (1,9-5,4 frente a 0,9-1,2 g/l en 17 h) y una menor producción de ácido láctico y propiónico. Estos resultados confirman, por lo tanto, que los microorganismos productores de AS pueden de hecho favorecerse añadiendo estos compuestos al medio de enriquecimiento (Lee y col., 2002a). Los cultivos de enriquecimiento tamponados con $MgCO_3$ mostraron una mayor producción de AS que los ensayos con TRIS (1,9-5,4 frente a 1,2-1,4 g/l en 17 h). Probablemente, esto es debido a i) la mayor capacidad tamponadora del $MgCO_3$, ii) su menor estrés osmótico debido a una menor solubilidad y iii) por la liberación de CO_2 a partir del ion carbonato, que es necesario para la biosíntesis del AS.

Tabla 3: Resultados de los cultivos de enriquecimiento para productores de AS a partir del contenido del rumen.

N.º exp	Tiempo inc [h]	Fuente de C	Tampón	Antibióticos	Agente red.	Fuente de C [g/l]	succínico [g/l]	láctico [g/l]	fórmico [g/l]	acético [g/l]	propiónico [g/l]	etanol [g/l]
1	24	glucosa	$MgCO_3$	-	-	0,0	0,0	3,7	0,6	2,8	0,0	0,0
2	24	glucosa	$MgCO_3$	-	-	0,0	0,0	3,6	0,4	2,7	0,0	0,0
3	24	glucosa	$MgCO_3$	-	-	0,0	0,0	3,9	0,4	2,6	0,0	0,0
4	24	xilosa	$MgCO_3$	-	-	0,0	2,3	3,8	0,2	5,7	0,0	0,0
5	24	xilosa	$MgCO_3$	-	-	0,0	0,0	3,4	0,0	2,7	0,5	0,0
6	24	xilosa	$MgCO_3$	-	-	0,0	1,8	3,4	0,0	2,7	0,0	0,0
7	17	arabinosa	$MgCO_3$	-	-	1,4	0,9	7,6	0,0	1,3	1,0	0,0
8	17	arabinosa	$MgCO_3$	-	-	1,9	0,9	7,4	0,0	1,3	1,0	0,0
9	17	arabinosa	$MgCO_3$	-	-	1,2	1,2	6,8	0,0	1,5	1,2	0,0
10	17	arabinosa	$MgCO_3$	las+mon	-	1,5	3,3	0,4	3,8	3,7	0,0	2,8
11	17	arabinosa	$MgCO_3$	las+mon	-	0,4	1,9	1,8	3,8	3,7	0,0	3,3
12	17	arabinosa	$MgCO_3$	las+mon	-	2,4	5,4	0,0	2,9	3,6	0,0	1,8
13	17	arabinosa	TRIS	las+mon	-	7,2	1,2	1,3	0,0	1,4	0,4	1,5
14	17	arabinosa	TRIS	las+mon	-	8,0	1,4	1,3	0,0	1,3	0,4	1,4
15	17	arabinosa	TRIS	las+mon	-	8,8	1,4	1,2	0,0	1,1	0,3	1,2

Para el enriquecimiento de productores de AS a partir de lodo digerido, la única fuente de C ensayada fue la arabinosa. Los resultados se resumen en la siguiente tabla. Estos experimentos indicaron que son necesarios tiempos cortos de incubación de 24 h o menos para prevenir el agotamiento del sustrato y el consumo de AS, probablemente por bacterias productoras de ácido propiónico:

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

Tabla 4: Resultados de los cultivos de enriquecimiento para productores de AS a partir de lodo digerido.

N.º exp	Tiempo inc [h]	Fuente de C	Tampón	Antibióticos	Agente red.	Fuente de C [g/l]	succínico [g/l]	láctico [g/l]	fórmico [g/l]	acético [g/l]	propiónico [g/l]	etanol [g/l]
1	8	arabinosa	$MgCO_3$	las+mon	-	13,3	0,2	0,1	0,2	0,2	0,0	1,1
2	8	arabinosa	$MgCO_3$	las+mon	-	13,4	0,2	0,1	0,2	0,2	0,0	1,1
3	8	arabinosa	$MgCO_3$	las+mon	-	13,1	0,2	0,1	0,2	0,2	0,0	1,1
1	24	arabinosa	$MgCO_3$	las+mon	-	0,0	1,6	1,2	3,5	3,9	0,4	3,5
2	24	arabinosa	$MgCO_3$	las+mon	-	0,0	1,6	1,3	3,4	4,0	0,4	3,5
3	24	arabinosa	$MgCO_3$	las+mon	-	0,0	1,7	1,3	3,1	3,8	0,4	3,4
1	30	arabinosa	$MgCO_3$	las+mon	-	0,0	0,0	1,3	3,4	4,0	1,4	3,1
2	30	arabinosa	$MgCO_3$	las+mon	-	0,0	0,9	1,4	3,4	4,1	0,9	3,2
3	30	arabinosa	$MgCO_3$	las+mon	-	0,0	0,0	1,4	3,0	4,0	1,4	3,1

Los resultados obtenidos en cultivos de enriquecimiento de pulpa se resumen en la tabla siguiente. El enriquecimiento de productores de AS a partir de pulpa solo tuvo éxito cuando se usaba pulpa de uvas rojas (tipo Spätburgunder). Es absolutamente necesario añadir anfotericina B al medio de enriquecimiento para suprimir la producción de etanol, probablemente causada por las levaduras del vino. La glucosa y la arabinosa fueron ambas fuentes de C adecuadas, pero no así la xilosa. Los tiempos de incubación necesarios para detectar inequívocamente la producción de AS fueron sustancialmente mayores que con material de muestra del rumen y de lodo digerido.

Tabla 5: Resultados de los cultivos de enriquecimiento para productores de AS a partir de pulpa.

N.º exp	Tipo de uva[a]	Tiempo inc [h]	Fuente de C	Tampón	Antibióticos	Agente red.	Fuente de C [g/l]	succínico [g/l]	láctico [g/l]	fórmico [g/l]	acético [g/l]	etanol [g/l]
1	roja	59	glucosa	$MgCO_3$	las+mon	L-cisteína	10,8	0,0	0,0	0,0	0,1	2,0
2	roja	59	glucosa	$MgCO_3$	las+mon	L-cisteína	10,8	0,0	0,0	0,0	0,1	2,0
3	roja	59	xilosa	$MgCO_3$	las+mon	L-cisteína	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0	1,6
4	roja	59	xilosa	MgCOg	las+mon	L-cisteína	12,7	0,1	0,1	0,0	0,0	1,5
5	roja	59	arabinosa	$MgCO_3$	las+mon	L-cisteína	13,4	0,1	0,1	0,0	0,0	1,6
6	roja	59	arabinosa	$MgCO_3$	las+mon	L-cisteína	13,3	0,0	0,1	0,0	0,0	1,5
7	blanca	59	glucosa	$MgCO_3$	las+mon	L-cisteína	0,0	0,0	0,0	0,0	0,6	6,2
8	blanca	59	glucosa	$MgCO_3$	las+mon	L-cisteína	0,1	0,0	0,0	0,0	0,6	5,9
9	blanca	59	xilosa	$MgCO_3$	las+mon	L-cisteína	12,8	0,0	0,2	0,0	0,0	1,5
10	blanca	59	xilosa	$MgCO_3$	las+mon	L-cisteína	13,0	0,0	0,2	0,0	0,0	1,6
11	blanca	59	arabinosa	$MgCO_3$	las+mon	L-cisteína	13,3	0,0	0,2	0,0	0,1	1,7
12	blanca	59	arabinosa	$MgCO_3$	las+mon	L-cisteína	13,4	0,0	0,2	0,0	0,1	1,8
13	roja	50	glucosa	$MgCO_3$	anf. B	L-cisteína	4,4	0,0	1,1	1,3	2,7	1,3
14	roja	50	glucosa	$MgCO_3$	anf. B	L-cisteína	0,0	6,9	0,0	0,3	3,2	0,4
15	roja	50	xilosa	$MgCO_3$	anf. B	L-cisteína	0,9	0,0	3,7	3,7	2,5	1,9
16	roja	50	xilosa	$MgCO_3$	anf. B	L-cisteína	5,9	0,0	1,8	1,8	2,5	1,2
17	roja	50	arabinosa	$MgCO_3$	anf. B	L-cisteína	13,5	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0
18	roja	50	arabinosa	$MgCO_3$	anf. B	L-cisteína	6,2	4,5	0,0	0,3	2,6	0,2
19	blanca	48	glucosa	$MgCO_3$	anf. B	L-cisteína	0,0	0,0	3,8	2,1	2,9	1,6
20	blanca	48	glucosa	$MgCO_3$	anf. B	L-cisteína	0,0	0,0	3,7	1,7	5,5	1,8
21	blanca	48	xilosa	$MgCO_3$	anf. B	L-cisteína	7,5	0,0	1,1	2,3	2,4	1,9
22	blanca	48	xilosa	$MgCO_3$	anf. B	L-cisteína	6,8	0,0	0,7	0,0	4,4	0,8
23	blanca	48	arabinosa	$MgCO_3$	anf. B	L-cisteína	6,2	0,0	0,6	0,2	2,8	1,2
24	blanca	48	arabinosa	$MgCO_3$	anf. B	L-cisteína	0,3	0,0	2,4	3,5	3,8	3,5

[a]roja = pulpa de uvas rojas (tipo Spätburgunder) como inóculo; blanca = pulpa de uvas blancas (MüllerThurgau) como inóculo.

2.2. Mejores resultados de los experimentos de enriquecimiento

En la tabla 6 a continuación se enumeran los mejores resultados obtenidos en cultivos de enriquecimiento para los productores de AS.

Tabla 6: Mejores resultados en los cultivos de enriquecimiento para los productores de AS.

Material de muestra	Rumen	Lodo digerido	Pulpa
Fuente de C	L-arabinosa	L-arabinosa	L-arabinosa
AS [g/l]	7,1	6,9	8,4
STY [g/(l h)][a]	0,2	0,4	0,1
Rendimiento [g/g][a]	0,5	0,5	0,6

[a] Rendimiento espacio-temporal y rendimiento de ácido succínico.

Dicha tabla indica que con cada uno de los tres materiales de muestra es posible recibir cultivos de enriquecimiento que producen AS. Los cultivos de enriquecimiento cuyo origen es lodo digerido mostraron mayores rendimientos espacio-temporales que aquellos del rumen y pulpa (0,4 frente a 0,2 y 0,1 g/[l h]). Sin embargo, se obtuvieron aislados productores de AS exclusivamente de cultivos de enriquecimiento productores de AS con material del rumen como inóculo. Aparentemente, el aislamiento de productores de AS a partir de lodo digerido y pulpa necesita estrategias más sofisticadas.

2.3. Aislados productores de ácido succínico

Los mejores aislados (= cultivos puros) que muestran producción de AS en experimentos de cultivos puros y sus características se resumen en la tabla siguiente. La concentración más alta de AS (8,8 g/l) y de rendimiento espacio-temporal (0,6 g/[l*h] se obtuvieron con DD1, un aislado de rumen.

Tabla 7: Características de los mejores aislados productores de ácido succínico (AS).

Aislado	DD1	DD1[a]	DD2
Origen	rumen	rumen	rumen
Fuente de C, enr.[b]	L-arabinosa	L-arabinosa	L-arabinosa
Fuente de C, pura[b]	L-arabinosa	D-glucosa	L-arabinosa
AS [g/l]	8,8	7,3	3,5
STY [g/(l h)][c]	0,6	0,5	0,1
Rendimiento [g/g][c]	0,6	0,5	0,3
Subproductos [g/l]			
- ácido fórmico	3,3	3,7	
- ácido acético	4,5	4,2	2,7
- ácido láctico	-	-	1,5
- etanol	-	-	2,7

[a] El aislado DD1 se ensayó dos veces en cultivo puro, una vez con glucosa y una vez con arabinosa.
[b] Fuente de C, enr. = fuente de C durante el enriquecimiento, Fuente de C, pura = fuente de C durante el experimento de cultivo puro.
[c] rendimiento espacio-temporal y rendimiento de ácido succínico.

3. Conclusión

El procedimiento establecido es adecuado para el enriquecimiento de productores de AS a partir del rumen, lodo digerido y pulpa. Sin embargo, se obtuvieron aislados productores de AS exclusivamente de cultivos de enriquecimiento productores de AS con material del rumen como inóculo. El aislado más prometedor es la bacteria DD1 del rumen. Usa glucosa y arabinosa para la producción de AS. En condiciones aún no optimizadas, se producen prácticamente 9 g/l de AS a partir de 15 g/l de arabinosa. La Figura 4 muestra una imagen de DD1 obtenida con un microscopio óptico.

Ejemplo 2: Preparación del banco de células de DD1

1. Preparación de los medios

La composición de los medios de cultivo se describe en la Tabla 8.

Tabla 8: Composición de medios sólidos y líquidos para la preparación de bancos de células de DD1.

Compuesto	**Concentración [g/l]**	**Concentración de la solución madre [g/l]**
Glucosa	variable[a]	650
Extracto de levadura Bacto (Becton Dickinson)	5	-
Peptona Bacto (Becton Dickinson)	5	-
$(NH_4)_2SO_4$	1	500

(continuación)

Compuesto	Concentración [g/l]	Concentración de la solución madre [g/l]
$CaCl_2$* $2H_2O$	0,2	20
$MgCl_2$* $6H_2O$	0,2	20
NaCl	1	100
K_2HPO_4	3	500
$MgCO_3$	variable[b]	-
Agar Bacto (solo para medios sólidos)	12	

[a] Las concentraciones de glucosa fueron 15 g/l (en placas) y 20 o 50 g/l (en medios líquidos).
[b] $MgCO_3$ (Riedel-de Haen, número de producto: 13117 de Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH) fueron 5 g/l (en placas) y 0 o 30 g/l (en medios líquidos).

Se mezclaron 5 g de extracto de levadura, 5 g de peptona, $MgCO_3$ y (para los medios sólidos) 12 g de Bacto-Agar en 900 ml de agua destilada y se esterilizaron en autoclave (20 min). Después de enfriar hasta aproximadamente 65 °C, se añadieron los componentes que faltaban como soluciones madre estériles. La glucosa, el sulfato de amonio y el K_2HPO_4 se esterilizaron en autoclave por separado. Los cloruros de Ca, Mg y Na se esterilizaron en autoclave juntos.

2. Preparación de MCB

Se inocularon dos placas de agar recientes con DD1 y se incubaron a 37 °C en un tarro anaerobio (Anaerocult A, Merck) durante toda la noche. Se retiró la biomasa de las placas y se resuspendió en el medio líquido libre de $MgCO_3$ con 20 g/l de glucosa para ajustar la DO_{600}≈10. La inoculación se llevó a cabo con 0,5 ml de esta suspensión celular. Los cultivos se llevaron a cabo en frascos de suero de 100 ml con tapones de caucho butilo herméticos a los gases (Ochs GmbH, Bovenden/Lenglern, Alemania) que contenían 50 ml del medio líquido con 20 g/l de glucosa y 30 g/l de $MgCO_3$ y una atmósfera de CO_2 con una sobrepresión de 0,8 bar. Los frascos de suero (en total 10) se incubaron a 37 °C, una velocidad de rotación de 160 rpm y un diámetro de agitación de 2,5 cm.

Para controlar el consumo de glucosa, se detuvo el cultivo de un frasco y se llevaron a cabo la recogida de muestras y el análisis de HPLC tras 0, 3, 4, 5, 7, 8 y 8,5 h. Tras 8,5 h (la concentración de glucosa fue de 3,4 g/l), se detuvo el cultivo. Se cargaron alícuotas de 0,5 ml de suspensión celular y 0,5 ml de glicerol estéril en viales de criogenización, se mezclaron y se almacenaron durante 13 h a -20 °C y posteriormente a -80 °C en forma de MCB. Se ensayó la pureza del MCB sembrando en estría un bucle del último vial de criogenización sobre placas de agar para el control de contaminación y comprobando en el cultivo líquido (medio tal como se describe en la tabla 8) el espectro del producto y la contaminación (mediante microscopía). Las condiciones de la HPLC fueron las mismas que las descritas en el Ejemplo 1.

3. Preparación de WCB

Se usó un vial del MCB para inocular un frasco de suero de 100 ml con un tapón de caucho butilo hermético a los gases (véase más arriba) que contenía 50 ml del medio líquido con 50 g/l de glucosa. La incubación se llevó a cabo durante 10 h a 37 °C en un incubador agitado (velocidad de rotación: 180 rpm, diámetro de agitación: 2,5 cm). Al final del cultivo la concentración de glucosa fue 20 g/l y el pH de aproximadamente 6,5. Se cargaron alícuotas de 0,5 ml de suspensión celular y 0,5 ml de glicerol estéril en viales de criogenización, se mezclaron y se almacenaron a -80 °C como WCB. Las comprobaciones de la pureza fueron las mismas que para el MCB. Las condiciones de la HPLC fueron las mismas que las descritas en el Ejemplo 1.

Ejemplo 3: Caracterización taxonómica de DD1

La caracterización taxonómica de la cepa DD1 se llevó a cabo mediante el análisis del ADNr 16S y 23S que se llevó a cabo como se describe a continuación:
La extracción del ADN genómico, la amplificación mediada por la PCR del ADNr 16S y la purificación de los productos de la PCR se llevaron a cabo tal como se describe en Rainey y col., 1996. Se amplificó un fragmento de ADN que contenía el ADNr 23S mediante el mismo procedimiento, usando el cebador directo 5'- AGTAATAACGAACGACACAG-3' y el cebador inverso 5'-AGCCGATTCCCTGACTAC- 3'. Los productos de la PCR purificados se secuenciaron usando el kit CEQ™DTCS-Quick Start (Beckman Coulter) según el protocolo del fabricante. Se usó el sistema de análisis genético CEQ™8000 para la electroforesis de los productos de reacción de secuenciación. Se usó el editor ae2 (Maidak y col., 1999) para alinear la secuencia del ADNr 16S de la cepa DD1 frente a las de miembros representativos de la subclase γ de las *Proteobacteria* de las bases de datos del EMBL y RDP. Para la construcción del árbol filogenético, se usaron los procedimientos de PHYLIP (Phylogeny Inference Package, versión 3.5c., distribuido por J. Felsenstein, Department of Genome Sciences, Universidad de Washington, Seattle, EE. UU.): Las distancias evolutivas emparejadas se calcularon usando el procedimiento de Jukes y Cantor (1969), el árbol filogenético se construyó a partir de estas distancias usando el procedimiento de unión de vecinos (Saitou y Nei, 1987).

El árbol filogenético basado en el ADNr 16S se ilustra en la Figura 1. Basándose en el análisis del ADNr 16S, el pariente más cercano de la cepa DD1 es *"Mannheimia succiniciproducens"* MBEL 55E con una similitud del 99,8 %. Esta cepa se aisló por científicos del Korea Advanced Institute of Science and Technology (KAIST) del rumen bovino

(Lee y col., 2002a; Lee y col., 2002b). El fragmento de ADNr 23S amplificado de DD1 se alineó con las secuencias del ADNr 23S de *"Mannheimia succiniciproducens"* MBEL 55E (número de referencia de la secuencia del genoma completo AE016827) para indicar las diferencias entre las cepas.

La Figura 2 muestra la secuencia del ADNr 16S de la cepa DD1. La Figura 3 muestra la secuencia del ADNr 23S de la cepa DD1 y un alineamiento con el ADNr 23S de *"Mannheimia succiniciproducens"* MBEL 55E (número de referencia de la secuencia del genoma completo AE016827) se muestra en el Anexo 1.

Ejemplo 4: Morfología celular y morfología de la colonia de DD1

Se usó un vial del WCB (ejemplo 2) para inocular un frasco de suero de 100 ml con un tapón de caucho butilo hermético a los gases (véase más arriba) que contenía 50 ml del medio líquido con 50 g/l de glucosa (composición y preparación como las descritas en el ejemplo 2). La incubación se llevó a cabo durante 15 h a 37 °C y 170 rpm (diámetro de agitación: 2,5 cm). Al final del cultivo, la concentración de glucosa se había reducido hasta aproximadamente 17 g/l (medida mediante HPLC, condiciones como las descritas en el ejemplo 1). Para examinar la morfología celular de DD1 se observaron células individuales usando microscopía óptica. Para caracterizar la morfología de las colonias de DD1, se sembró en estría un bucle de la suspensión celular en placas de infusión de cerebro corazón (Infusión de Cerebro Corazón Bacto, número de producto: 237500 solidificado con 12 g/l de Bacto Agar, número de producto: 214010; ambos de Becton, Dickinson and Company) y se incubaron en condiciones aerobias y anaerobias (Anaerocult A, Merck) a 37 °C.

Las células de DD1 aparecen como varillas que se presentan en forma individual, en parejas o en cadenas cortas (véase la figura 4). Después de 24 h de incubación, las colonias eran circulares, de color blanco-amarillo, translúcidas y con un diámetro de 0,5-1 µm (crecimiento aerobio) y de 1-2 µm (crecimiento anaerobio).

Ejemplo 5: Utilización de diferentes fuentes de C

Se ensayó la utilización de diferentes fuentes de C por DD1 en las condiciones descritas por Lee y col., 2002a.

1. Preparación del medio

La composición del medio de cultivo se describe en la Tabla 9.

Tabla 9: Composición del medio para las pruebas de utilización de diferentes fuentes de C.

Compuesto	**Concentración [g/l]**	**Concentración de la solución madre [g/l]**
Fuente de C	10	250
Extracto de levadura Bacto (Becton Dickinson)	5	100
Polipeptona peptona (Becton Dickinson)	10	100
$(NH_4)_2SO_4$	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	-

El extracto de levadura, la polipeptona y el $MgCO_3$ se esterilizaron en autoclave juntos. Después de enfriar, se añadieron los componentes que faltaban como soluciones madre estériles. La glucosa y el resto de fuentes de C, el sulfato de amonio y el K_2HPO_4 se esterilizaron en autoclave por separado. Los cloruros de Ca, Mg y Na se esterilizaron en autoclave juntos. Se añadió Na_2S*$9H_2O$ hasta una concentración final de 1 mg/l para garantizar las condiciones anaerobias.

2. Cultivos y analíticas

Para cultivar el cultivo de siembra, se usó un vial del WCB para inocular un frasco de 100 ml de suero con tapón de caucho butilo hermético a los gases (véase más arriba) que contenía 50 ml del medio líquido descrito en la Tabla 9, pero con 20 g/l de glucosa y una atmósfera de CO_2 con una sobrepresión de 0,8 bar. La incubación se llevó a cabo durante 13 h a 37 °C y 160 rpm (diámetro de agitación: 2,5 cm). La suspensión celular se centrifugó (Biofuge primo R, Heraeus,) a 5000 g durante 5 minutos y el sedimento celular se lavó y después se resuspendió en 50 ml de medio sin una fuente de carbono y sin $MgCO_3$ para generar un inóculo sin glucosa (todas las etapas a temperatura ambiente y en la cámara anaerobia).

Los cultivos principales se cultivaron en frascos de suero de 100 ml que contenían en su interior 50 ml de medio líquido con 10 g/l de la respectiva fuente de C (D-manitol, D-fructosa, D-xilosa, sacarosa, maltosa, lactosa, xilitol, inositol, D-sorbitol, glicerol, L-arabinosa, D-galactosa o D-manosa) y una atmósfera de CO_2 con una sobrepresión de 0,8 bar. Para la prueba de utilización de glicerol, se usó la calidad "Glicerol 99 % de pureza" (Riedel-de Haen, número de producto: 15523-1L-R de Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze, Alemania). La inoculación se llevó a cabo con 1,5 ml del inóculo sin glucosa. Los frascos se incubaron a 37 °C, y 160 rpm (diámetro de agitación: 2,5 cm). La

utilización de la respectiva fuente de C por DD1 se consideró positiva cuando se consumieron al menos 3 g/l de la fuente de C en 24 h. Para verificar los resultados obtenidos en el cultivo principal, se usó 1 ml del cultivo principal respectivo para inocular 50 ml de medio de cultivo reciente con 10 g/l de la fuente de C respectiva. Los resultados se confirmaron, por lo tanto, en dos cultivos principales posteriores. El consumo de las fuentes de C se cuantificó mediante HPLC tal como se describe en el ejemplo 1. Cuando se midió el glicerol, la temperatura de la columna se ajustó a 50 °C para lograr una separación suficiente de AS, ácido láctico y glicerol, que tienen tiempos de retención similares.

3. Resultados

Los resultados se resumen en la siguiente Tabla 10.

Tabla 10: Utilización de diferentes fuentes de C por DD1 y MBEL 55E.

Fuente de C	**DD1[a]**	**MBEL 55E[b]**
Manitol	+	+
Fructosa	+	+
Xilosa	+	+
Sacarosa	+	+
Maltosa	+	+
Lactosa	+	+
Xilitol	-	-
Inositol	-	-
Sorbitol	-	-
Glicerol	+	-
Arabinosa	+	ND
Galactosa	+	ND
Manosa	+	ND

Análisis del consumo de cada fuente de C después de 24 h. Los cultivos se llevaron a cabo por duplicado.
[b] datos de Lee y col., 2002a. ND = no determinado.

Dicha tabla muestra que el patrón de utilización de la fuente de C de las dos cepas difiere respecto al glicerol. DD1 puede metabolizar el glicerol, que no es usado por MBEL 55E.

Además de sacarosa, D-glucosa y D-fructosa, DD1 utiliza D-xilosa, L-arabinosa, D-galactosa y D-manosa. Por lo tanto, DD1 utiliza todos los tipos de monosacáridos de la lignocelulosa (Kamm y col., 2006; Lee, 1997). La utilización de L-arabinosa, D-galactosa y D-manosa por MBEL55E no fue ensayada por Lee y col., 2002a.

Ejemplo 6: Formación de AS y subproductos a partir de glicerol y diferentes hexosas y pentosas

La productividad de ácido succínico (AS) de DD1 a partir de glicerol, D-xilosa, L-arabinosa, D-galactosa y D-manosa se evaluó en frascos de suero con 10 g/l de la fuente de C respectiva (10 g/l de glucosa como referencia).

1. Preparación del medio

La composición y preparación de los medios de cultivo fueron iguales a las del ejemplo 2 (cultivo de siembra) y al ejemplo 5 (cultivos principales).

2. Cultivos y analíticas

El crecimiento del cultivo de siembra en medio líquido con 50 g/l de glucosa y 30 g/l de $MgCO_3$ se llevó a cabo como se ha descrito en el ejemplo 2. La preparación del inóculo sin glucosa se llevó a cabo como se ha descrito en el ejemplo 5.

El cultivo de los principales cultivos con 10 g/l de glicerol, sacarosa, D-xilosa, D-fructosa, L-arabinosa, D-galactosa, D-manosa o D-glucosa y 10 g/l $MgCO_3$ se realizó como se ha descrito en el ejemplo 5. El consumo de la respectiva fuente de C y la producción de AS y subproductos se cuantificaron mediante HPLC como se ha descrito en el ejemplo 5.

3. Resultados

En la tabla 11 a continuación se resumen los resultados.

Tabla 11: Formación de AS y subproductos a partir de glicerol y diferentes azúcares por DD1.

	glic	**sac**	**gluc**	**fruc**	**xil**	**ara**	**gal**	**man**
t_c [h][a]	9	4	4	4	6	6	6	5

(continuación)

	glic	sac	gluc	fruc	xil	ara	gal	man
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
Ac_{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
Rendimiento [g/g][d]	1,2	0,6	0,6	0,5	0,6	0,6	0,6	0,6

[a] tiempo de cultivo.
[b] consumo de fuente de carbono.
[c] formación de ácido succínico, láctico, fórmico y acético.
[d] rendimiento espacio-temporal y rendimiento de ácido succínico.

La tabla 11 muestra que en todos los casos se forman cantidades sustanciales de AS. La producción de AS a partir de glicerol (glic) en lugar de sacarosa (sac), D-glucosa (gluc), D-fructosa (fruc), D-xilosa (xil), L-arabinosa (ara), D-galactosa, (gal) o D-manosa (man) por DD1 tiene dos ventajas obvias: i) un rendimiento sustancialmente mayor, ii) una formación de ácido fórmico y acético sustancialmente menor. Por otra parte, la productividad de AS (rendimiento espacio-temporal) con glicerol es ligeramente menor que con los azúcares. Sin embargo, la productividad de AS de DD1 con glicerol es sustancialmente mayor que el valor obtenido con *Anaerobiospirillum succiniciproducens* por Lee y col., 2001 (0,14 g AS/[l h]).

Especialmente, el rendimiento sustancialmente mayor logrado con glicerol es un resultado muy interesante: puede contribuir a una clara reducción del coste de producción del ácido succínico, las sales de ácido succínico y BDO/GBL/THF o las pirrolidonas de fermentación producidas a partir de este, respectivamente, en particular si puede aplicarse el glicerol en bruto y barato de las plantas de biodiésel.

Ejemplo 7: Formación de AS y subproductos a partir de diferentes gliceroles en bruto

Se evaluó la productividad de AS de DD1 a partir de diferentes gliceroles en bruto (C1 a C3) en ensayos en frasco de suero con 10 g/l del glicerol respectivo (10 g/l de glicerol puro [P1] como referencia).

1. Preparación del medio

La composición del medio se describe en la siguiente Tabla 12.

Tabla 12: Composición del medio para los ensayos de formación de AS a partir de diferentes gliceroles en bruto.

Compuesto	Concentración [g/l] C	Concentración de la solución madre [g/l]
Fuente de C	variable[a]	variable
Extracto de levadura Bacto (Becton Dickinson)	5	100
Peptona Bacto (Becton Dickinson)	5	100
$(NH_4)_2SO_4$	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] Las concentraciones fueron 50 g/l de glucosa en el cultivo de siembra y de 10 g/l del glicerol respectivo en el cultivo principal.

Se esterilizaron $MgCO_3$ y agua (1,5 g y 40 ml) en frascos de suero de 100 ml (121 °C, 20 min). Después de enfriar, se añadieron soluciones estériles independientes de los otros compuestos. El extracto de levadura, la peptona, el sulfato de amonio y el K_2HPO_4 se esterilizaron todos por separado mediante filtración de la solución madre respectiva. Para los cloruros de Ca, Mg y Na se preparó una solución madre que se esterilizó por filtración. La glucosa y los diferentes gliceroles se esterilizaron todos por separado (121 °C, 20 min). Para el ensayo de referencia con glicerol puro (P1) se usó la calidad "Glicerol 99% de pureza" (Riedel-de Haen, número de producto: 15523-1L-R) de Honeywell Specialty Chemicals Seelze GmbH, Seelze, Alemania.

2. Cultivos y analíticas

El cultivo de siembra se cultivó en un frasco de suero de 100 ml con un tapón de caucho butilo hermético a los gases (véase más arriba) que contenía 50 ml del medio descrito en la Tabla 12 con 50 g/l de glucosa y una atmósfera de CO_2 con una sobrepresión de 0,8 bar. La inoculación se llevó a cabo con 1 ml del WCB (ejemplo 2). La incubación se llevó a cabo durante 15 h a 37 °C y 170 rpm (diámetro de agitación: 2,5 cm). Al final del cultivo, la concentración de

glucosa se había reducido hasta aproximadamente 17 g/l.

La suspensión celular se centrifugó (Biofuge primo R, Heraeus) a 5000 g durante 5 minutos y el sedimento celular se lavó y después se resuspendió en 50 ml del medio sin glucosa y sin $MgCO_3$ para generar un inóculo sin glucosa.

Los cultivos principales se cultivaron en frascos de suero de 100 ml que contenían en su interior 50 ml del medio con 10 g/l del glicerol respectivo y una atmósfera de CO_2 con una sobrepresión de 0,8 bar. La inoculación se llevó a cabo con 2,0 ml del inóculo sin glucosa. Los frascos se incubaron durante 9 h a 37 °C, y 170 rpm (diámetro de agitación: 2,5 cm).

El consumo de la fuente de C respectiva (glucosa en el cultivo de siembra, glicerol en el cultivo principal) y la producción de AS y subproductos se midió mediante HPLC como se ha descrito en el ejemplo 5.

3. Resultados

En la siguiente tabla 13 se resumen los resultados.

Tabla 13: Formación de AS y subproductos a partir de diferentes gliceroles por DD1.

Tipo de glicerol	**C1**	**C2**	**C3**	**P1**
Producido[a]	ecoMotion	Biopetrol	Glacon Chemie	Sigma-Aldrich
Pureza [%][b]	90	42	76	99
t_c[h][c]	9	9	9	9
Δc_{Gl} [g/l][d]	-6,3	-6,9	-6,5	-5,4
Ac_{SA} [g/l][e]	+7,6	+8,4	+7,4	+6,2
Ac_{LA} [g/l][e]	0	+0,1	+0,1	+0,1
Ac_{FA} [g/l][e]	+0,3	+0,3	+0,3	+0,3
Ac_{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
Rendimiento [g/g][f]	1,2	1,2	1,1	1,1

[a] ecoMotion GmbH, Stemberg, Alemania; Biopetrol Schwarzheide GmbH, Schwarzheide, Alemania; Glacon Chemie, Merseburg, Alemania; Riedel de Haen (número de producto: 15523-1L-R) de Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze, Alemania.
[b] Análisis del productor.
[c] tiempo de cultivo.
[d] consumo de glicerol.
[e] formación de ácido succínico, láctico, fórmico y acético.
[f] rendimiento espacio-temporal y rendimiento de ácido succínico.

La Tabla 13 muestra que después de 9 h la concentración de AS y, por lo tanto, el STY obtenido con los gliceroles en bruto C1 a C3 (de 7,4 a 8,4 g AS/l y de 0,8 a 0,9 g de AS/[l h]) es en todos los casos mayor que los respectivos valores obtenidos con el glicerol puro P1 (6,2 g AS/l y 0,7 g AS/[l h]). Los gliceroles en bruto tienen, por lo tanto, además de un menor precio, la ventaja de una mejor productividad. Los rendimientos obtenidos con los gliceroles en bruto C1 a C3 (1,1 a 1,2 g AS/g de glicerol) son similares al valor respectivo obtenido con el glicerol puro P1 (1,1 g AS/g de glicerol).

Ejemplo 8: Tolerancia de DD1 al amoniaco y la glucosa

Un enfoque común para la producción fermentativa de ácido succínico y/o sales de amonio de ácido succínico a partir de glucosa podría ser un cultivo por lotes alimentado controlado con NH_3 con un determinado nivel inicial de glucosa. Esta configuración necesita que la cepa sea tolerante tanto a NH_3/NH_4OH como a la glucosa. Para ensayar en DD1 estas propiedades, se llevaron a cabo cultivos con NH_4OH como agente de control del pH y diversos niveles de glucosa.

1. Preparación del medio

La composición del medio de cultivo se describe en la Tabla 14.

Tabla 14: Composición del medio para los cultivos por lotes controlados por pH con diversos niveles de glucosa.

Compuesto	**Concentración [g/l]**	**Concentración de la solución madre [g/l]**
Glucosa	Variable[a]	650
Extracto de levadura Bacto (Becton Dickinson)	5	-
Peptona Bacto (Becton Dickinson)	5	-
$(NH_4)_2SO_4$	1	500
$CaCl_2$*$2H_2O$	0,2	20
$MgCl_2$*$6H_2O$	0,2	20
NaCl	1	100

(continuación)

Compuesto	Concentración [g/l]	Concentración de la solución madre [g/l]
K_2HPO_4	3	500
L-cisteína	0,24	120
$MgCO_3$ (Riedel-de Haen 13117)	2	-

[a]La concentración de glucosa inicial en el precultivo fue 50 g/l y en los fermentadores 25, 50 o 75, respectivamente.

El extracto de levadura, peptona y $MgCO_3$ se esterilizaron en autoclave juntos en los fermentadores y en los frascos de suero. La glucosa, el sulfato de amonio y el K_2HPO_4 se esterilizaron en autoclave por separado. Los cloruros de Ca, Mg y Na se esterilizaron en autoclave juntos. Después de enfriar los fermentadores y los frascos de suero, se añadieron los componentes que faltaban como soluciones madre estériles. Para los precultivos, se usó la misma composición del medio pero el $MgCO_3$ se ajustó a 30 g/l.

2. Cultivos y analíticas

Los precultivos se cultivaron en condiciones anaerobias en frascos de suero de 100 ml con tapones de caucho butilo herméticos a los gases (Ochs GmbH, Bovenden/lenglern, Alemania) que contenían 50 ml de medio del precultivo a 37 °C en un incubador de agitación (velocidad de rotación: 160 rpm, diámetro de agitación: 2,5 cm). La inoculación de los precultivos se realizó con 1 ml de un banco de células de trabajo DD1 en la cámara anaerobia (MAKS MG 500, Meintrup-dws). Inmediatamente después de la inoculación, se sustituyó la atmósfera de gas (80 % de N_2, 15 % de CO_2 y 5 % de H_2) por CO_2 puro con una sobrepresión de aproximadamente 0,8 bar. Después de 16 a 18 h de incubación, se mezclaron dos frascos en la caja anaerobia y en cada caso se usaron 15 ml para inocular los fermentadores (Six-fors, Infors, Suiza) que contenían 300 ml de medio de cultivo que había sido gaseado durante la noche con CO_2 para garantizar las condiciones sin oxígeno. La temperatura de cultivo fue 37 °C, el pH de 6,5 se mantuvo con NH_4OH al 25 %. La corriente de gas CO_2 y la velocidad del agitador se ajustaron a 0,1 l/min y 500 rpm, respectivamente. Se cuantificaron el consumo de glucosa y la producción de AS mediante HPLC, como se ha descrito en el ejemplo 1.

3. Resultados

Se muestran los resultados en la Figura 5.
En los cultivos por lotes controlados con NH_4OH con hasta 40 g/l de glucosa se forma AS en 48 h. Por lo tanto, DD1 tiene un fuerte potencial de síntesis de ácido succínico y/o de sales de amonio de ácido succínico que son favorables para la conversión química en THF/BDO/GBL y pirrolidonas (documento WO-A-2006/066839).

La tasa de producción inicial de AS en los ensayos con 75 g/l de glucosa es ligeramente menor que en los ensayos con 50 y 25 g/l. Sin embargo, entre las 6 y las 12 h ya no se observa dicha diferencia, lo que indica que la inhibición del sustrato no es un problema a niveles de glucosa de hasta 75 g/l.

Ejemplo 9: Efecto de la temperatura de cultivo y el pH en la formación de AS por DD1

En este experimento, se variaron la temperatura y el pH de cultivo en cultivos por lotes controlados con NH_4OH con 75 g/l de glucosa.

1. Preparación del medio

Aparte de la concentración constante de glucosa, la composición y preparación del medio fueron iguales a las del ejemplo 8, "Tolerancia de DD1 al amoniaco y la glucosa".

2. Cultivos y analíticas

Aparte de los diferentes valores de temperatura y pH de cultivo ensayados, las condiciones experimentales de los cultivos y los análisis de HPLC fueron idénticas a las del ejemplo 8 "Tolerancia de DD1 al amoniaco y la glucosa".

3. Resultados

Se muestran los resultados en la Figura 6. La Figura 6 muestra que los dos ensayos a 37 °C y pH 6,5 son muy similares tanto respecto al consumo de glucosa como a la producción de AS, lo que indica una pequeña variabilidad. Basándose en esta variabilidad, los ensayos que se llevaron a cabo a pH 6,5 muestran que a entre 34,5 y 39,5 °C la temperatura de cultivo no tiene impacto en el rendimiento del procedimiento. Sin embargo, los ensayos a 37 °C indican que una reducción del pH en 0,5 unidades da como resultado un evidente aumento del pH de 0,5 unidades y una ligera disminución de la productividad de AS. Basándose en estos resultados, los cultivos posteriores de DD1, en caso de ser posible el control del pH, se llevaron a cabo a pH 6,5.

Ejemplo 10: Efecto de los ingredientes de los medios complejos sobre el cultivo de DD1

El enriquecimiento y aislamiento de DD1 se llevó a cabo en un medio de cultivo que contenía 5 g/l de extracto de levadura y 5 g/l de peptona. Por lo tanto, los primeros experimentos con DD1 se llevaron a cabo en un medio con estos compuestos. Ya que estos contribuyen al coste de las materias primas e introducen impurezas adicionales, se

probaron diferentes composiciones de medios en las que el extracto de levadura y la peptona se reducen y sustituyen por el licor de maíz fermentado más económico (Solulys L48L, Roquette), respectivamente. La composición inicial de los medios de los ensayos se indica por números (que representan la concentración, es decir, 2, 5, 15 o 25 g/l) y letras (que representan el compuesto complejo respectivo, es decir, extracto de levadura, peptona o licor de maíz fermentado).

1. Preparación del medio

Aparte de la modificación respectiva de la concentración del extracto de levadura (y la peptona) y el licor de maíz fermentado adicional, la composición y la preparación del medio fueron iguales a las del ejemplo 8 "Tolerancia de DD1 al amoniaco y la glucosa". La concentración de glucosa del lote fue de 50 g/l en todos los ensayos.

2. Cultivos y analíticas

Las condiciones experimentales fueron idénticas a las del ejemplo 8 "Tolerancia de DD1 al amoniaco y la glucosa". Todos los cultivos se llevaron a cabo a 37 °C, los cultivos en fermentadores se mantuvieron a pH 6,5 con NH_4OH al 25 %. Los análisis de HPLC se llevaron a cabo como se ha descrito en el ejemplo 8.

3. Resultados

Se muestran los resultados en la Figura 7. La comparación de los ensayos "5Y5P" y "5Y" muestra que puede omitirse la peptona sin efecto negativo alguno en la producción de AS. La sustitución parcial de extracto de levadura por CSL tampoco da como resultado una producción reducida de ácido succínico, (ensayo "5Y" frente a los ensayos "2Y15C"). Sin embargo, la completa sustitución del extracto de levadura por CSL da como resultado pérdidas de productividad moderadas.

El espectro de subproductos de los ensayos "5Y5P" y "5Y" se muestra en la Figura 8. La Figura 8 muestra que la omisión de la peptona en el medio de cultivo da como resultado concentraciones sustancialmente menores de ácido fórmico y acético, mientras que las concentraciones de ácido láctico fueron comparables en ambos ensayos. Este experimento indica un potencial para la mejora del medio mediante i) reducción del coste de las materias primas, ii) reducción de las impurezas introducidas por los compuestos del medio e iii) reducción de la formación de productos secundarios durante el cultivo.

Ejemplo 11: Relación de DD1 con el oxígeno

Ya que la producción fermentativa de AS es un procedimiento que depende de condiciones anaerobias, el cultivo de DD1 para la producción de AS tiene que llevarse a cabo en ausencia de oxígeno. Sin embargo, es muy importante saber si DD1 también tolera la presencia de oxígeno. Si este fuera el caso, la cepa podría manejarse en condiciones aerobias, lo que hace que el trabajo de laboratorio sea mucho más fácil y rápido. Por lo tanto, se ensayó la cepa DD1 en experimentos en matraces agitados con glucosa.

1. Preparación del medio

La composición y preparación del medio fueron iguales a las descritas en la Tabla 8.

2. Cultivos y analíticas

Los cultivos de siembra anaerobios se cultivaron en frascos de suero de 100 ml con tapones de caucho butilo herméticos a los gases (véase más arriba) que contenían 50 ml de medio con 50 g/l de glucosa y 30 g/l de $MgCO_3$ y una atmósfera de CO2 con una sobrepresión de 0,8 bar a 37 °C y 160 rpm, (diámetro de agitación: 2,5 cm) durante 16 h. La inoculación se realizó con 1 ml del WCB (ejemplo 2). se usaron 7,5 ml de estos precultivos para inocular los cultivos principales aerobios.

Los cultivos principales aerobios (150 ml de medio con 60 g/l de glucosa y 80 g/l de $MgCO_3$) se cultivaron a 37 °C y 200 rpm (diámetro de agitación: 2,5 cm) en matraces Erlenmeyer de 500 ml con dos deflectores y tapones de algodón. Se midieron el consumo de sustrato y la formación de producto mediante HPLC, como se ha descrito en el ejemplo 1.

3. Resultados

Se muestran los resultados en la Figura 9. Los resultados muestran claramente el consumo aerobio de glucosa por la cepa DD1. Los productos principales son ácido acético y láctico, que también son los productos dominantes de las células cultivadas en condiciones aerobias de *"Mannheimia succiniciproducens"* MBEL 55E, (Lee y col., 2002a). Los niveles iniciales de AS se introducen por el precultivo anaerobio y se consumen ampliamente después de 15 h de cultivo. Los datos demuestran claramente que DD1 es tolerante al oxígeno.

Ejemplo 12: Ensayo de DD1 en las condiciones descritas por KAIST

El pariente más próximo de DD1 es *"Mannheimia succiniciproducens"* MBEL 55E, una cepa aislada por KAIST (véase más arriba). Para comparar DD1 con dicha cepa se llevó a cabo el experimento de cultivo descrito por KAIST (Fig. 2b

en Lee y col., 2002a y Fig. 3 en Lee y col., 2002b) con DD1.

1. Preparación del medio

La composición del medio de cultivo fue idéntica al experimento respectivo de Lee y col., 2002b y se describe en la tabla 15 a continuación.

Tabla 15: Composición del medio para cultivos por lotes de DD1 en las condiciones descritas por Lee y col., 2002b.

Compuesto	**Concentración [g/l]**	**Concentración de la solución madre [g/l]**
Glucosa	20	650
Extracto de levadura Bacto (Becton Dickinson)	5	-
Polipeptona peptona (Becton Dickinson)	5	-
$(NH_4)_2SO_4$	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	-

El extracto de levadura, peptona y $MgCO_3$ se esterilizaron en autoclave juntos en los fermentadores y en los frascos de suero. La glucosa, el sulfato de amonio y el fosfato de potasio se esterilizaron en autoclave por separado. Los cloruros de Ca, Mg y Na se esterilizaron en autoclave juntos. Después de enfriar los fermentadores y los frascos de suero, se añadieron los componentes que faltaban como soluciones madre estériles. Para los cultivos de siembra se utilizó el mismo medio.

2. Cultivos y analíticas

El cultivo de siembra se cultivó en condiciones anaerobias en un frasco de suero de 100 ml con tapones de caucho butilo herméticos a los gases que contenían 50 ml de medio a 39 °C en un incubador agitado (velocidad de rotación: 160 rpm, diámetro de agitación: 2,5 cm). La inoculación del cultivo de siembra se realizó con 1 ml del WCB (ejemplo 2) en la cámara anaerobia (MAKS MG 500, Meintrup dws). Inmediatamente después de la inoculación, se sustituyó la atmósfera de gas (80 % de N_2, 15 % de CO_2 y 5 % de H_2) por CO_2 puro con una sobrepresión de aproximadamente 0,8 bar. Después de 9 h de incubación, se inoculó el fermentador con 30 ml para iniciar el cultivo en el fermentador (Six-fors, Infors Suiza) que contenía 300 ml de medio de cultivo que se había gaseado durante la noche con CO_2 para garantizar las condiciones sin oxígeno. La temperatura de cultivo se mantuvo a 39 °C y el pH a 6,5 con NaOH 5 M. La corriente de gas CO_2 se ajustó hasta 0,25 vvm. La velocidad del agitador se ajustó a 500 rpm.

Se midieron el consumo de glucosa y la formación de AS y subproductos mediante HPLC, como se ha descrito en el ejemplo 1.

3. Resultados

Los resultados se resumen en la Figura 10. A las 5 h de incubación, se han consumido 18,9 g/l de glucosa y se han producido 12,3 g/l de ácido succínico, 4,5 g/l de ácido acético y 3,3 g/l de ácido fórmico por DD1, lo que indica un espectro del producto que es similar al de MBEL55E. Sin embargo, el rendimiento espacio-temporal obtenido con DD1 para el ácido succínico es de 2,5 g/(l h), que es claramente mayor al obtenido con la cepa MBEL55E (1.8 g/[l h], Lee y col., 2002b). El rendimiento es de 0,7 g de ácido succínico/g de glucosa, que es similar al de la cepa MBEL55E.

Ejemplo 13: Crecimiento de DD1 en medio sintético

Es favorable usar un medio sintético sin ingredientes complejos para la fermentación de DD1 para mejorar el procesamiento corriente abajo y diseñar un medio sintético más simple para una fermentación económica. Por lo tanto, se diseñó un medio sintético para DD1. Entre tanto, también se había publicado un medio sintético para el pariente cercano, Mannheimia succiniciproducens (Song y col., 2008). Se habían determinado compuestos esenciales y estimuladores para el crecimiento de DD1. Comparando los resultados con Mannheimia succiniciproducens se observaron diferencias evidentes, que apuntaban a un medio de cultivo más económico para la cepa DD1.

1. Preparación del medio

El medio de crecimiento sintético para DD1 se desarrolló en relación a otros medios de crecimiento sintéticos para bacterias del rumen (Nili y Brooker, 1995, McKinlay y col., 2005), antes de la experiencia de los presentes inventores con otras bacterias y llevando a cabo experimentos de omisión individual. Finalmente, el medio contenía 50 g/l de glucosa, 1 g/l de $(NH_4)_2SO_4$, 0,2 g/l de $CaCl_2*2H_2O$, 0,2 g/l de $MgCl_2*6H_2O$, 1 g/l de NaCl, 3 g/l de K_2HPO_4, 1 mg/l de ácido nicotínico, 1,5 mg/l de ácido pantoténico, 5 mg/l de piridoxina, 5 mg/l de riboflavina, 5 mg/l de biotina, 1,5 mg/l de tiamina HCl, 0,26 g/l de lisina, 0,15 g/l de treonina, 0,05 g/l de metionina, 0,71 g/l de ácido glutámico, 0,06 g/l de histidina, 0,07 g/l de triptófano, 0,13 g/l de fenilalanina, 0,06 g/l de tirosina, 0,5 g/l de serina, 0,5 g/l de glicina, 0,5 g/l

de cisteína, 0,1 g/l de β-alanina, 0,27 g/l de alanina, 0,19 g/l de valina, 0,23 g/l de leucina, 0,16 g/l de isoleucina, 0,33 g/l de ácido aspártico, 0,1 g/l de asparagina, 0,13 g/l de prolina, 0,15 g/l de arginina y 0,1 g/l de glutamina.

Los frascos de suero que contenían 50 ml de medio complejo o sintético se esterilizaron en autoclave con agua y 30 g/l de $MgCO_3$ como el sistema tampón. La glucosa, el sulfato de amonio y el fosfato de potasio se esterilizaron por separado. Los cloruros de Ca, Mg y Na se esterilizaron juntos. Se incluyeron vitaminas y aminoácidos en diversas soluciones madre y se esterilizaron por filtración. Después de enfriar los frascos de suero, se añadieron los componentes como soluciones madre estériles.

El medio complejo estándar se preparó como se describe en el ejemplo 12 sin usar polipeptona y partiendo de 50 g/l de glucosa y 30 g/l de $MgCO_3$. Para los cultivos de siembra y algunos experimentos de control del cultivo principal se usó medio complejo.

2. Cultivos y analíticas

El cultivo de siembra se cultivó en un medio complejo en condiciones anaerobias usando un frasco de suero de 100 ml con tapones de caucho butilo herméticos a los gases que contenían 50 ml de medio a (37) °C en un incubador agitado (velocidad de rotación: 170 rpm, diámetro de agitación: 2,5 cm). La inoculación del primer cultivo de siembra se llevó a cabo en condiciones aerobias con 1 ml del WCB (ejemplo 2) en condiciones estériles. Inmediatamente después de la inoculación se sustituyó la atmósfera de gas aeróbico por CO_2 puro con una sobrepresión de aproximadamente 0,8 bar. Después de 8 h de incubación se centrifugaron 2 ml del primer cultivo de siembra y se lavaron tres veces usando una solución de lavado estéril que contenía 2 g/l de $(NH_4)_2SO_4$, 0,4 g/l de $CaCl_2*2H_2O$, 0,4 g/l de $MgCl_2*6H_2O$, 2 g/l de NaCl y 6 g/l de K_2HPO_4 antes de la inoculación en el segundo frasco de cultivo de 100 ml.

La incubación del segundo cultivo de siembra se produjo durante 20 h, como se ha descrito para el primer cultivo de siembra, antes de usar 2 ml del segundo cultivo de nuevo con el fin de inocular el cultivo principal, que se incubó durante otras 20 h. Para determinar los compuestos esenciales o estimuladores, se omitió la vitamina o el aminoácido de interés en el segundo cultivo de siembra y en el cultivo principal. Se midieron el consumo de glucosa y la formación de ácido succínico mediante HPLC como se ha descrito en el ejemplo 1.

3. Resultados

Los resultados se resumen en la tabla 16. Se observó que el medio que omitía la biotina y la tiamina HCl no favorecían el crecimiento y la producción de ácido succínico. Por lo tanto, se demostró que la biotina y la tiamina HCl son compuestos esenciales para el crecimiento de DD1. Fueron suficientes concentraciones de biotina menores de 0,6 mg/l para el crecimiento de DD1. Se observó que el aminoácido cisteína no era esencial para el crecimiento de DD1, ya que la omisión de cisteína condujo a una producción similar de ácido succínico a la del control que contenía cisteína.

A diferencia de estos resultados, la biotina fue descrita como no esencial pero estimuladora y la cisteína como esencial para el crecimiento de *Mannheimia succiniciproducens* (Song y col, 2008). La tiamina HCl es esencial para ambos organismos. Se espera que una cepa prototrófica para cisteína tenga un medio de producción más sencillo y más económico para la producción de ácido succínico.

Tabla 16: Consumo de glucosa y producción de ácido succínico por DD1 cultivada en medio sintético

Condiciones de crecimiento	Consumo de glucosa [g/l]	Producción de ácido succínico [g/l]
Medio sintético completo	49,93	30,35
Medio sintético sin biotina	0,8	0,08
Medio sintético sin tiamina HCl	6,27	0,81
Medio sintético sin cisteína	48,88	30,01

Ejemplo 14: Metabolización de glicerol por la cepa DD1

Se analizó adicionalmente la productividad de la cepa DD1 en presencia de glicerol como fuente de carbono utilizando el siguiente medio y condiciones de cultivo optimizadas:

1. Preparación del medio y cultivo

Se cultivó DD1 del modo siguiente. Se sembraron células de una solución madre congelada en una placa de agar BHI (Becton Dickinson). Se desprendieron las células y se suspendieron en medio BHI reciente y se incubaron en un frasco de suero anaerobio a 37 °C durante 5,5 h. Se inocularon las células en el medio que contenía los compuestos descritos en la tabla 17 usando frascos de suero de 100 ml. La DO inicial a 600 nm fue 0,1 (determinada en un recorrido de 1 ml). Los componentes 1-7 del medio se esterilizaron en autoclave juntos, el compuesto 8 se esterilizó en autoclave en el frasco de suero, los compuestos 9 y 10 se esterilizaron en autoclave por separado y se añadieron al medio final. Se burbujearon los frascos de suero al menos tres veces con CO_2 a través de los tapones de caucho butilo y se dejó con una sobrepresión de CO_2 de 0,8 bar. Los frascos de suero se incubaron a 200 rpm y 37 °C. Después de 24 h, se abrieron los frascos de suero y se determinaron los metabolitos mediante HPLC como se describe en el ejemplo 1.

Tabla 17: Composición del medio

	Compuesto	Concentración [g/l]
1	Extracto de levadura Bacto (Becton Dickinson)	5
2	Polipeptona peptona (Becton Dickinson)	10
3	$(NH_4)_2SO_4$	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

Tabla 18: Resultados del ejemplo 14

Metabolización del glicerol	
tc_c [h][c]	24
Δc_{Gl} [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
Ac_{aa} [g/l][e]	+2,5
STY [g/(l h)][f]	1,47
Rendimiento [g/g][f]	1,24
Relación SA/FA[g]	14,7
Relación SA/AA[g]	14,1

[c] tiempo de cultivo.
[d] consumo de glicerol.
[e] formación de ácido succínico, láctico, fórmico y acético.
[f] rendimiento espacio-temporal y rendimiento de ácido succínico.
[g] relación g/l de ácido succínico por g de producto secundario de ácido fórmico (AF) y ácido acético (AA)

2. Resultados:

Se obtuvieron los siguientes resultados, como se describe en la Tabla 18. DD1 produjo 35,3 g/l de ácido succínico a partir de 28,4 g/l de glicerol en 24 h, dando lugar a un rendimiento espacio-temporal de 1,47 g/l de ácido succínico por h, que es superior a otros ejemplos documentados de metabolización del glicerol (Lee y col., 2001). El rendimiento de 1,24 g/g era próximo al rendimiento teórico descrito de 1,29 g de ácido succínico por g de glicerol, si se logra la conversión de 1M de glicerol y 1M de CO_2 a 1M de ácido succínico (Song y Lee, 2006).

Ejemplo 15: Producción de succinato a partir de glicerol y maltosa

Se determinó la productividad de DD1 en presencia de dos fuentes de carbono. Se cultivó DD1 en presencia del disacárido maltosa y de glicerol simultáneamente.

1. Preparación del medio y cultivo

Se sembraron células de una solución madre congelada en una placa de agar BHI (Becton Dickinson). Se desprendieron las células y se suspendieron en medio BHI reciente y se incubaron en un frasco de suero anaerobio a 37 °C durante 5,5 h. El medio se describe en la Tabla 19. Se usaron frascos de suero de 200 ml. Las células se inocularon con una DO inicial de 0,1 (determinada en un recorrido de 1 ml con un fotómetro Pharmacia a 600 nm). Se burbujearon los frascos de suero al menos tres veces con CO_2 a través de los tapones de caucho butilo y se dejó con una sobrepresión de CO_2 de 0,8 bar. Los frascos de suero se incubaron a 200 rpm y 37 °C.

Tabla 19: Preparación del medio para el ejemplo 15

Compuesto	**Concentración [g/l]**
Maltosa * H_2O	22
Glicerol	56,82
Extracto de levadura 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

(continuación)

Compuesto	Concentración [g/l]
Antiespumante polipropilenglicol 1200	0,1

El cultivo de siembra se inoculó con 2 ml de un cultivo congelado cultivado en condiciones anaerobias en un frasco de suero de 200 ml con tapones de caucho butilo herméticos a los gases que contenían 50 ml de medio a 37 °C en un incubador agitado (velocidad de rotación: 160 rpm, diámetro de agitación: 2,5 cm). El frasco se burbujeó con CO_2 con una sobrepresión de aproximadamente 0,8 bar. Después de 8 h de incubación se inoculó el fermentador con 50 ml para iniciar el cultivo en el fermentador que contenía 1 l de medio de cultivo que se gaseó con CO_2 para asegurar condiciones sin oxígeno. La temperatura de cultivo se mantuvo a 37 °C y el pH a 6,5 sin adición de bases excepto el tampón $MgCO_3$ en el medio. La corriente de gas CO_2 se ajustó hasta 0,2 vvm. La velocidad del agitador se ajustó a 300 rpm. Se midieron el consumo de maltosa y glicerol y la formación de AS y subproductos mediante HPLC, como se ha descrito en el ejemplo 1. Las células se cultivaron a 37 °C y la biomasa se determinó tomando una muestra y disolviendo el $MgCO_3$ residual mediante la adición de HCl 1M. Después de disolver $MgCO_3$, las células se lavaron con agua y se secaron por liofilización. La biomasa seca se determinó mediante pesada.

Resultados:

Los resultados se resumen en la tabla 20. A las 16 h de inoculación se han consumido 36,5 g/l de glicerol y 11,2 g/l de maltosa y se han formado 57,54 g/l de ácido succínico, 3,41 g/l de ácido acético y 3,7 g/l de ácido fórmico por DD1. El rendimiento espacio-temporal obtenido con DD1 para el ácido succínico es 3,4 g/(l h), que es claramente superior al publicado previamente para la cepa MBEL55E y *Anaerobiospirillum succiniciproducens* y es superior al de otras cepas descritas en la bibliografía (Lee y col, 2002b, Lee y col, 2001, Song and Lee, 2006).

El rendimiento de ácido succínico se determinó como 1,2 g de ácido succínico por g de fuente de carbono para la suma de glicerol y maltosa. Este rendimiento también es superior al de las cepas descritas en la bibliografía (Lee y col, 2002b, Lee y col, 2001, Song and Lee, 2006).

El rendimiento espacio-temporal de 3,7 g/(l h) de ácido succínico es superior al de las cepas descritas en la bibliografía (Song y col, 2006).

Además se observó que la productividad específica del ácido succínico de 0,77 [g g $DCW^{-1}h^{-1}$][h] era superior a la de las cepas descritas en la bibliografía (Song y col, 2006).

Tabla 20: Resultados del ejemplo 15

Glicerol y maltosa como fuentes de carbono	
t_c [h][b]	16
Biomasa BTM [g/l]	4,7
Δ $C_{Glicerol}$ [g/l][d]	-36,5
Δ $C_{Ácido\ succínico}$ [g/l][e]	57,54
Δ $C_{Maltosa}$ [g/l][d]	-11,2
Δ c_{fA} [g/l][e]	3,7
Δ c_{AA} [g/l][e]	3,41
STY [g/(lh)][f]	3,4
Rendimiento de succinato [g/g][g]	1,2
Productividad específica de AS [g g $DCW^{-1}h^{-1}$][h]	0,77

[b] tiempo de cultivo
[c] biomasa seca determinada por solubilización de $MgCO_3$.
[d] consumo de glicerol o maltosa
[e] formación de ácido succínico, fórmico y acético
[f] rendimiento espacio-temporal g de ácido succínico por (l *h)
[g] rendimiento en g de ácido succínico por g de sustrato (suma de maltosa y glicerol)
[h] Productividad específica: g de ácido succínico por g de biomasa (peso celular seco) por h

Resumen de los experimentos

1. La cepa DD1 tiene características muy prometedoras:

Parámetros de productividad atractivos para glicerol (título de AS: hasta 57 g/l, rendimiento espacio-temporal de 3,4 g/(l h) de ácido succínico, una productividad específica de ácido succínico de 0,77 g/(g DCW h) y un rendimiento de carbono de hasta 1,24 g/g de carbono consumido.

- Se toleran niveles de glucosa y glicerol de al menos 75 g/l y 70 g/l respectivamente.
- La D-glucosa, D-xilosa, L-arabinosa, D-galactosa, D-manosa se convierten eficientemente en AS, lo que indica su idoneidad para la producción de AS en una estrategia de bio-refinería
- El glicerol, especialmente el material no purificado de las plantas de biodiésel, también se usa de manera eficaz para la producción de AS; Los rendimientos, los rendimientos espacio-temporales y las productividades específicas y las proporciones de producto/subproducto son sustancialmente mayores y mejores que con D- glucosa y otros

azúcares.

- Se tolera el NH_3/NH_4OH para el control de pH, por lo tanto es posible la producción de ácido succínico y/o sales de amonio de ácido succínico
- La D-glucosa, D-xilosa, L-arabinosa, D-galactosa, D-manosa se convierten eficientemente en AS, lo que indica su idoneidad para la producción de AS en una estrategia de bio-refinería
- El glicerol, especialmente el material no purificado de las plantas de biodiésel, también se usa de manera eficaz para la producción de AS; Los rendimientos y las proporciones de producto/subproducto son sustancialmente mayores que con D-glucosa y otros azúcares.
- La combinación de fuentes de carbono diferentes se convierte de manera eficaz en ácido succínico
- El crecimiento celular aerobio es posible, lo que es una clara ventaja para el manejo general de la cepa en el laboratorio, especialmente para el desarrollo posterior de la cepa
- Se mejoró sustancialmente el medio de cultivo sin pérdidas de productividad.

Conclusiones:

1. La cepa tiene un excelente potencial para la producción de ácido succínico y/o de sales de ácido succínico, por ejemplo, sales de amonio, que pueden convertirse en THF/BDO/GBL y pirrolidonas.

2. La producción de ácido succínico para aplicaciones en monómeros es otra opción atractiva.

Referencias

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

Jukes TH, Cantor CR (1969) Evolution of protein molecules. In: Mammalian Protein Metabolism, vol 3, pp 21-132. Edited by Munro HN. New York: Academic Press

Kamm B, Kamm M, Schmidt M, Hirth T, Schulze M (2006) Lignocellulose-based chemical products and product family trees. In: Kamm B, Gruber, PR, Kamm M (eds.) Biorefineries - Industrial Processes and products. Status Quo and future directions. Vol. 2. Wiley-VCH, Weinheim.

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

Lee PC, Lee SY, Hong SA, Chang HN (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 PC, Lee WG, Lee SY, Chang HN (2001) Succinic acid production with reduced by-product formation in the fermentation of Anaerobiospirillum succiniciproducens using glycerol as a carbon source. Biotech Bioeng 72: 41-48.

Lee SY, Chang HN, Lee PC, Lee WG (2002b) Organic acid producing microorganism and process for preparing organic acids employing the same. WO 02/00846 A1.

Maidak BL, Cole JR, Parker Jr TC, Garrity GM, Larsen N, Li B, Lilburn TG, McCaughey MJ, Olsen GJ, Overbeek R, Pramanik S, Schmidt TM, Tiedje JM, Woese CR (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, PG y col. ARCHIVES OF MICROBIOLOGY 165 387-396 1996.

Rainey FA, Ward-Rainey N, Kroppenstedt RM, 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 and Lee S (2006) Production of succinic acid by bacterial fermentation. Enz Microb Tech 39: 352-361.

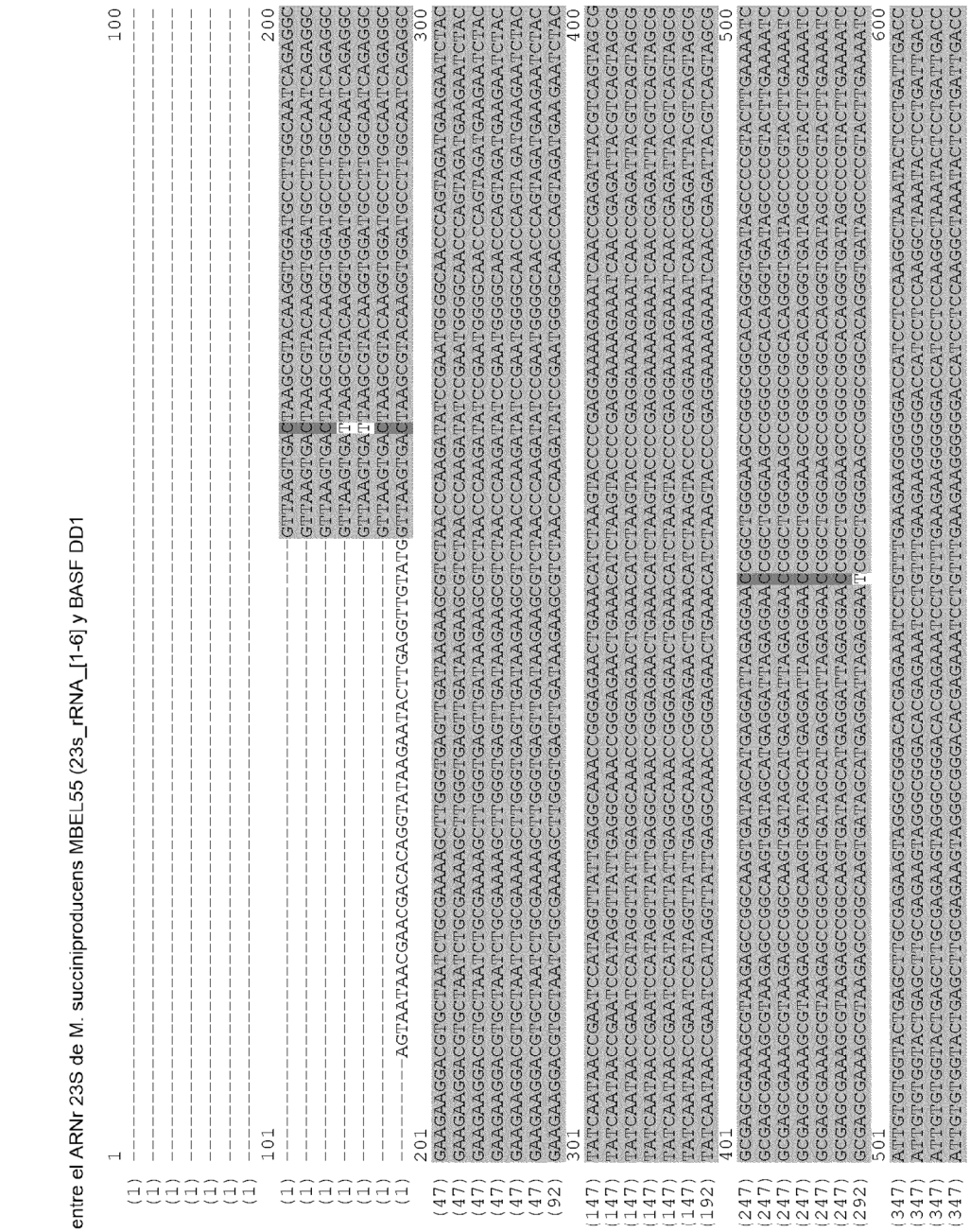
Song H, Kim T, Choi B, Choi S, Nielsen L, Chang H, Lee S (2008) Development of chemically defined medium for Mannheimia succiniciproducens based on its genome sequence. Appl Microbiol Biotechnol 79: 263-272.

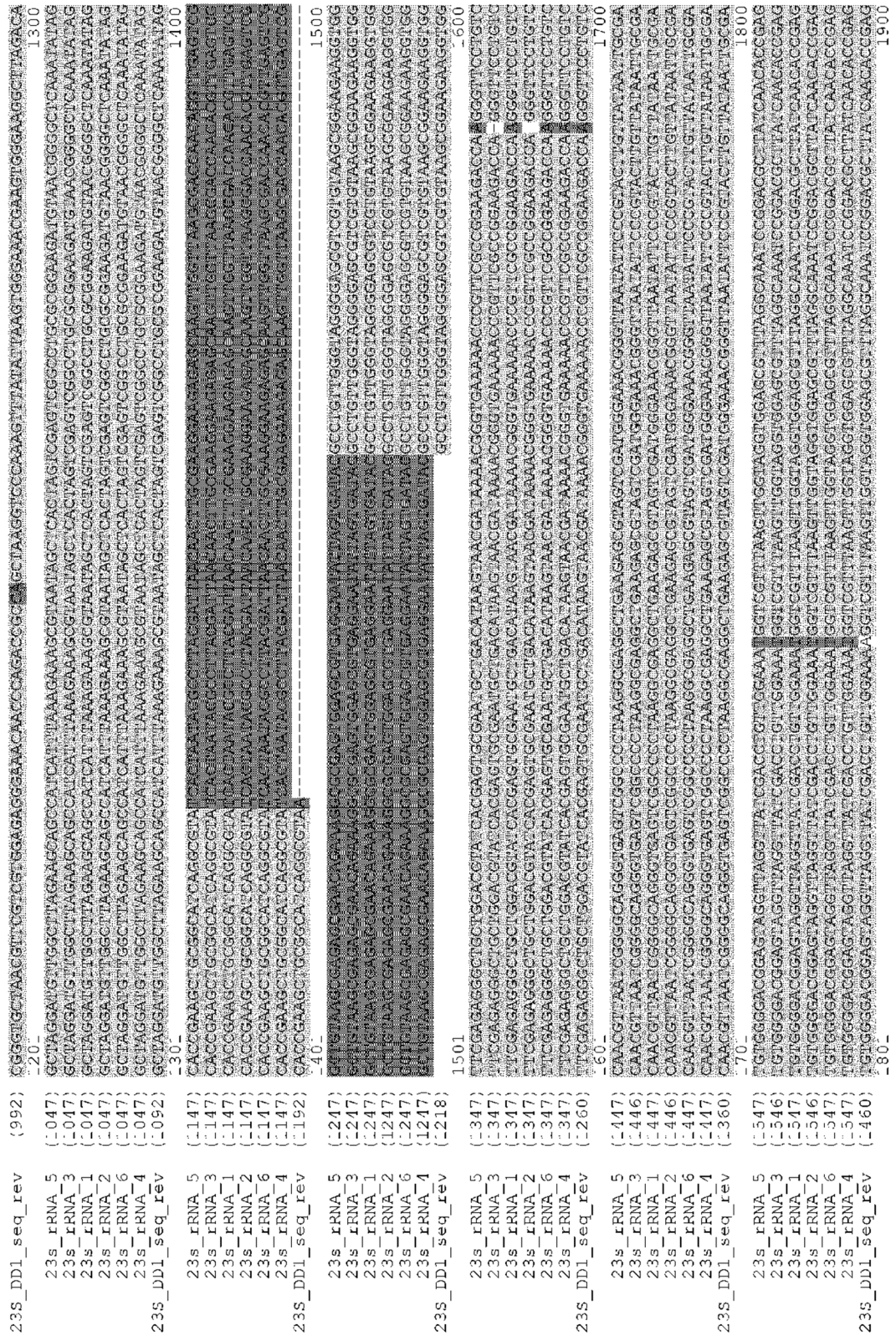
Yazdani S, Gonzalez R (2007) Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. Curr Opinion Biotechnol 18: 213-219.

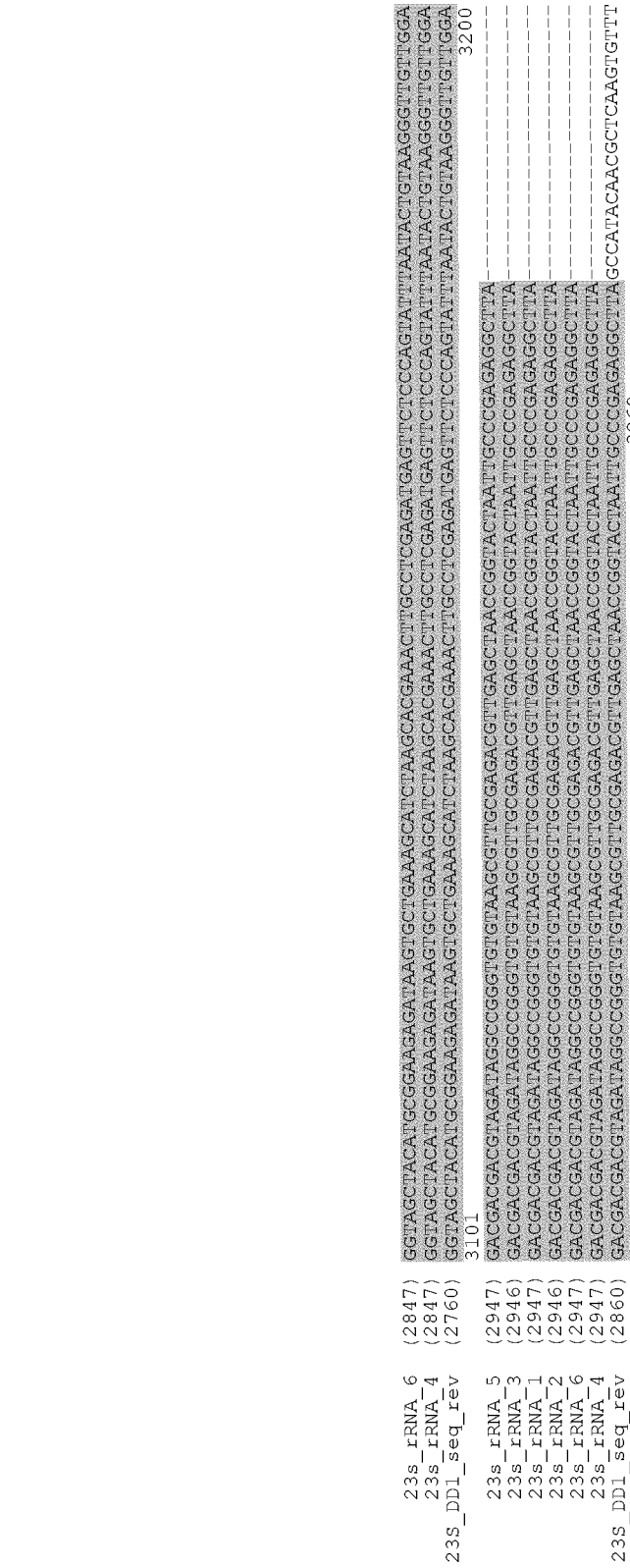
En el contexto de la presente invención, se depositó una cepa bacteriana DD1 en el DSMZ el 11 de agosto de 2006 con el número de depósito DSM 18541.

ANEXO 1

Alineamiento completo entre el ARNr 23S de M. succiniproducens MBEL55 (23s_rRNA_[1-6] y BASF DD1







LISTADO DE SECUENCIAS

<110> BASF SE

<120> Productor de ácido succínico

<130> M/47282

<160> 2

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1
<211> 1517
<212> ADN
<213> Pasteurella sp.

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1517)
<223> ADNr 16S

<400> 1

tttgatcctg gctcagattg aacgctggcg gcaggcttaa cacatgcaag tcgaacggta 60

gcgggaggaa agcttgcttt ctttgccgac gagtggcgga cgggtgagta atgcttgggg 120

atctggctta tggaggggga taacgacggg aaactgtcgc taataccgcg taatatcttc 180

ggattaaagg gtgggacttt cgggccaccc gccataagat gagcccaagt gggattaggt 240

agttggtggg gtaaaggcct accaagccga cgatctctag ctggtctgag aggatgacca 300

gccacactgg aactgagaca cggtccagac tcctacggga ggcagcagtg gggaatattg 360

cacaatgggg ggaaccctga tgcagccatg ccgcgtgaat gaagaaggcc ttcgggttgt 420

aaagttcttt cggtgacgag gaaggtgttt gttttaatag gacaagcaat tgacgttaat 480

cacagaagaa gcaccggcta actccgtgcc agcagccgcg gtaatacgga gggtgcgagc 540

gttaatcgga ataactgggc gtaaagggca tgcaggcgga cttttaagtg agatgtgaaa 600

gccccgggct taacctggga attgcatttc agactgggag tctagagtac tttagggagg 660

ggtagaattc cacgtgtagc ggtgaaatgc gtagagatgt ggaggaatac cgaaggcgaa 720

ggcagcccct tgggaagata ctgacgctca tatgcgaaag cgtggggagc aaacaggatt 780

agataccctg gtagtccacg cggtaaacgc tgtcgatttg gggattgggc tttaggcctg 840

gtgctcgtag ctaacgtgat aaatcgaccg cctggggagt acggccgcaa ggttaaaact 900

caaatgaatt gacgggggcc cgcacaagcg gtggagcatg tggtttaatt cgatgcaacg 960

cgaagaacct tacctactct tgacatccag agaatcctgt agagatacgg gagtgccttc 1020

gggagctctg agacaggtgc tgcatggctg tcgtcagctc gtgttgtgaa atgttgggtt 1080

aagtcccgca acgagcgcaa cccttatcct ttgttgccag catgtaaaga tgggaactca 1140

aaggagactg ccggtgacaa accggaggaa ggtggggatg acgtcaagtc atcatggccc 1200

ttacgagtag ggctacacac gtgctacaat ggtgcataca gagggcggcg ataccgcgag 1260

gtagagcgaa tctcagaaag tgcatcgtag tccggattgg agtctgcaac tcgactccat 1320

gaagtcggaa tcgctagtaa tcgcaaatca gaatgttgcg gtgaatacgt tcccgggcct 1380

tgtacacacc gcccgtcaca ccatgggagt gggttgtacc agaagtagat agcttaacct 1440

tcgggggggg cgtttaccac ggtatgattc atgactgggg tgaagtcgta acaaggtaac 1500

cgtaggggaa cctgcgg 1517

<210> 2
<211> 3008
<212> ADN
<213> Pasteurella sp.

<220>
<221> misc-feature
<222> (1)..(3008)
<223> ADNr 23S

<400> 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

REIVINDICACIONES

1. Una cepa mutante de una cepa bacteriana DD1 como la depositada en el DSMZ que tiene el número de depósito DSM 18541, que tiene la capacidad de producir ácido succínico a partir de glicerol y en la que dicha cepa mutante tiene un ADNr 16S de SEQ ID NO: 1; o una secuencia, que muestra una homología de secuencia de al menos 99,9 % con la SEQ ID NO: 1.

2. La cepa de la reivindicación 1 que convierte glicerol en ácido succínico con un coeficiente de rendimiento YP/S de al menos 0,5 g/g.

3. La cepa de una de las reivindicaciones precedentes, que tiene un ADNr 23S de SEQ ID NO: 2; o una secuencia, que muestra una homología de secuencia de al menos 95, 96, 97, 98, 99 o 99,9 % con la SEQ ID NO: 2 y que retiene la capacidad de utilizar glicerol.

4. La cepa de una de las reivindicaciones precedentes, que muestra al menos una de las siguientes características metabólicas adicionales:

a) producción de ácido succínico a partir de sacarosa;
b) producción de ácido succínico a partir de maltosa
c) producción de ácido succínico a partir de D-fructosa;
d) producción de ácido succínico a partir de D-galactosa;
e) producción de ácido succínico a partir de D-manosa;
f) producción de ácido succínico a partir de D-glucosa;
g) producción de ácido succínico a partir de D-xilosa;
h) producción de ácido succínico a partir de L-arabinosa;
i) ninguna utilización de xilitol, inositol, sorbitol;
j) crecimiento tanto en condiciones aerobias como anaerobias;
k) crecimiento con concentraciones iniciales de glucosa de 75 g/l o más
l) crecimiento con concentraciones iniciales de glicerol de 70 g/l o más
m) tolerancia al amoníaco.

5. La cepa de una de las reivindicaciones precedentes, que convierte sacarosa, maltosa, D-fructosa, D-glucosa, D-xilosa, L-arabinosa, D-galactosa, D-manosa y/o glicerol en ácido succínico con un coeficiente de rendimiento YP/S de al menos 0,5 g/g.

6. La cepa de una de las reivindicaciones precedentes, que tiene al menos una de las siguientes características

a) convertir al menos 28 g/l de glicerol en al menos 28,1 g/l de ácido succínico, con un coeficiente de rendimiento YP/S de al menos 1,0 g/g;
b) convertir al menos una fuente de carbono seleccionada de sacarosa, maltosa, D-fructosa, D-glucosa, D-xilosa, L-arabinosa, D-galactosa, D-manosa, y/o glicerol en ácido succínico con un rendimiento de productividad específica de al menos 0,6 g g DCW^{-1} h^{-1} de ácido succínico;
c) convertir al menos una fuente de carbono seleccionada de sacarosa, maltosa, D-fructosa, D-glucosa, D-xilosa, L-arabinosa, D-galactosa, D-manosa, y/o glicerol en ácido succínico con un rendimiento espacio-temporal para el ácido succínico de al menos 2,2 g/(l h) de ácido succínico;
d) convertir al menos 28 g/l de al menos una fuente de carbono seleccionada de sacarosa, maltosa, D-fructosa, D-glucosa, D-xilosa, L-arabinosa, D-galactosa, D-manosa, y/o glicerol en ácido succínico con un rendimiento espacio-temporal para el ácido succínico de al menos 2,2 g/(l h);
e) convertir al menos una fuente de carbono seleccionada de sacarosa, maltosa, D-fructosa, D-glucosa, D-xilosa, L-arabinosa, D-galactosa, D-manosa, y/o glicerol en ácido succínico con un rendimiento de productividad específica de al menos 0,6 g g DCW^{-1} h^{-1} de ácido succínico y un rendimiento espacio-temporal para el ácido succínico de al menos 2,2 g/(l h).

7. Un procedimiento para la producción fermentativa de un ácido orgánico o una sal o un derivado del mismo, procedimiento que comprende las etapas de:

a) incubar una cepa bacteriana como se define en una de las reivindicaciones precedentes en un medio que contiene una fuente de carbono asimilable y cultivar dicha cepa en condiciones que favorecen la formación del ácido orgánico deseado; y
b) obtener dicho ácido orgánico o sal o derivado del mismo del medio.

8. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que la fermentación se realiza a una temperatura en el intervalo de 10 a 60 °C a un pH de 5,0 a 9,0 en presencia de dióxido de carbono.

9. El procedimiento de la reivindicación 7 u 8, en el que dicho ácido orgánico es ácido succínico.

10. El procedimiento de una de las reivindicaciones 7 a 9, en el que la fuente de carbono asimilable se selecciona de glicerol, sacarosa, maltosa, D-fructosa, D-galactosa, D-manosa, D-glucosa, D-xilosa, L-arabinosa, productos de

descomposición del almidón, celulosa, hemicelulosa y lignocelulosa; y mezclas de los mismos.

11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que la fuente de carbono es glicerol o una mezcla de glicerol y al menos otra fuente de carbono seleccionada de sacarosa, maltosa, D-fructosa, D-galactosa, D-manosa, D-glucosa, D-xilosa, y L-arabinosa.

12. El procedimiento de una de las reivindicaciones 7 a 11, en el que la concentración de la fuente de carbono asimilable se ajusta a un valor en un intervalo de 5 a 80 g/l.

13. Un procedimiento para la producción fermentativa de ácido succínico o una sal o un derivado del mismo, procedimiento que comprende las etapas de:

a) incubar una cepa bacteriana mutante de la familia *Pasteurellaceae* como se define en una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 6 en un medio que contiene al menos una fuente de carbono asimilable y cultivar dicha cepa en condiciones que favorecen la formación del ácido orgánico deseado;
b) obtener dicho ácido orgánico o sal o derivado del mismo del medio; **caracterizado** adicionalmente **por** al menos una de las siguientes características:

c) la conversión de al menos 28 g/l de glicerol en al menos 28,1 g/l de ácido succínico, con un coeficiente de rendimiento YP/S de al menos 1,0 g/g;
d) la conversión de al menos una fuente de carbono seleccionada de sacarosa, maltosa, D-fructosa, D-glucosa, D-xilosa, L-arabinosa, D-galactosa, D-manosa, y/o glicerol en ácido succínico con un rendimiento de productividad específica de al menos 0,6 g g DCW^{-1} h^{-1} de ácido succínico;
e) la conversión de al menos una fuente de carbono seleccionada de sacarosa, maltosa, D-fructosa, D-glucosa, D-xilosa, L-arabinosa, D-galactosa, D-manosa, y/o glicerol en ácido succínico con un rendimiento espacio-temporal para el ácido succínico de al menos 2,2 g/(l h) de ácido succínico;
f) la conversión de al menos 28 g/l de al menos una fuente de carbono seleccionada de sacarosa, maltosa, D-fructosa, D-glucosa, D-xilosa, L-arabinosa, D-galactosa, D-manosa, y/o glicerol en ácido succínico con un rendimiento espacio-temporal para el ácido succínico de al menos 2,2 g/(l h);
g) la conversión de al menos una fuente de carbono seleccionada de sacarosa, maltosa, D-fructosa, D-glucosa, D-xilosa, L-arabinosa, D-galactosa, D-manosa, y/o glicerol en ácido succínico con un rendimiento de productividad específica de al menos 0,6 g g DCW^{-1} h^{-1} de ácido succínico y un rendimiento espacio-temporal para el ácido succínico de al menos 2,2 g/(l h).

14. Un procedimiento para la producción fermentativa de ácido succínico o una sal o un derivado del mismo, procedimiento que comprende las etapas de:

a) incubar una cepa bacteriana mutante de la familia *Pasteurellaceae* como se define en una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 6 en un medio que contiene al menos una fuente de carbono asimilable y cultivar dicha cepa en condiciones que favorecen la formación del ácido orgánico deseado;
b) obtener dicho ácido orgánico o sal o derivado del mismo del medio; **caracterizado** adicionalmente **por**
c) la conversión de al menos una fuente de carbono seleccionada de sacarosa, maltosa, D-fructosa, D-glucosa, D-xilosa, L-arabinosa, D-galactosa, D-manosa, y/o glicerol en ácido succínico con un rendimiento espacio-temporal para el ácido succínico de al menos 2,2 g/(l h) de ácido succínico, en particular al menos 2,5, 2,75, 3 o 3,25 g/(l h) de ácido succínico.

15. El procedimiento de una de las reivindicaciones 7 a 14, realizado de forma discontinua o continua.

16. Un procedimiento para la producción de ácido succínico y/o sales de amonio del ácido succínico, procedimiento que comprende la producción fermentativa de ácido succínico de acuerdo con una de las reivindicaciones 7 a 14 y el control del pH con amoníaco o una solución acuosa del mismo o NH_4HCO_3, $(NH_4)_2CO_3$, NaOH, Na_2CO_3, $NaHCO_3$, KOH, K_2CO_3, $KHCO_3$, $Mg(OH)_2$, $MgCO_3$, $MgH(CO_3)_2$, $Ca(OH)_2$, $CaCO_3$, $Ca(HCO_3)_2$, CaO, $CH_6N_2O_2$, C_2H_7N y mezclas de los mismos.

17. Un procedimiento para la producción de tetrahidrofurano (THF) y/o 1,4-butanodiol (BDO) y/o gamma-butirolactona (GBL), que comprende

a) la producción fermentativa de ácido succínico y/o sales de ácido succínico, como se define en la reivindicación 16, y
b1) bien la hidrogenación catalítica directa del ácido libre obtenido en THF y/o BDO y/o GBL o
b2) la esterificación química del ácido succínico libre obtenido y/o las sales del ácido succínico en su correspondiente éster de di-alquilo inferior y la posterior hidrogenación catalítica de dicho éster en THF y/o BDO y/o GBL.

18. Un procedimiento para la producción de pirrolidonas que comprende

a) la producción fermentativa de sales de amonio del ácido succínico como se define en la reivindicación 16, y
b) la conversión química de las sales de amonio del ácido succínico en pirrolidonas.

19. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 18, en el que dicho glicerol, que se usa como fuente de carbono asimilable, se obtiene por escisión del éster de triacilglicéridos.

20. El procedimiento de la reivindicación 19, en el que el glicerol es un producto residual como el que se obtiene a partir de la fabricación del biodiésel.

21. El uso de una cepa bacteriana como se define en una de las reivindicaciones 1 a 6 para la producción fermentativa de un producto de química orgánica fina.

22. El uso de la reivindicación 21, en el que el producto de química orgánica fina es ácido succínico o una sal o derivado del mismo.

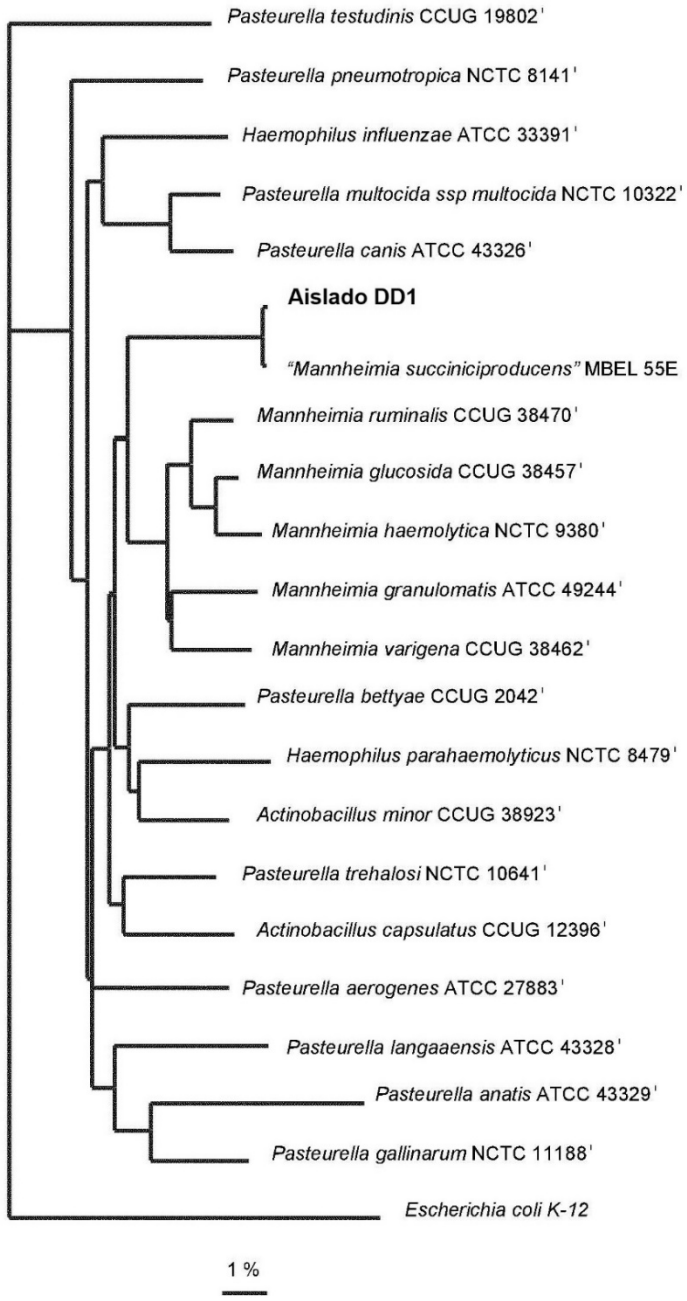

Pasteurella testudinis CCUG 19802'
Pasteurella pneumotropica NCTC 8141'
Haemophilus influenzae ATCC 33391'
Pasteurella multocida ssp multocida NCTC 10322'
Pasteurella canis ATCC 43326'
Aislado DD1
"Mannheimia succiniciproducens" MBEL 55E
Mannheimia ruminalis CCUG 38470'
Mannheimia glucosida CCUG 38457'
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 atacccttga 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

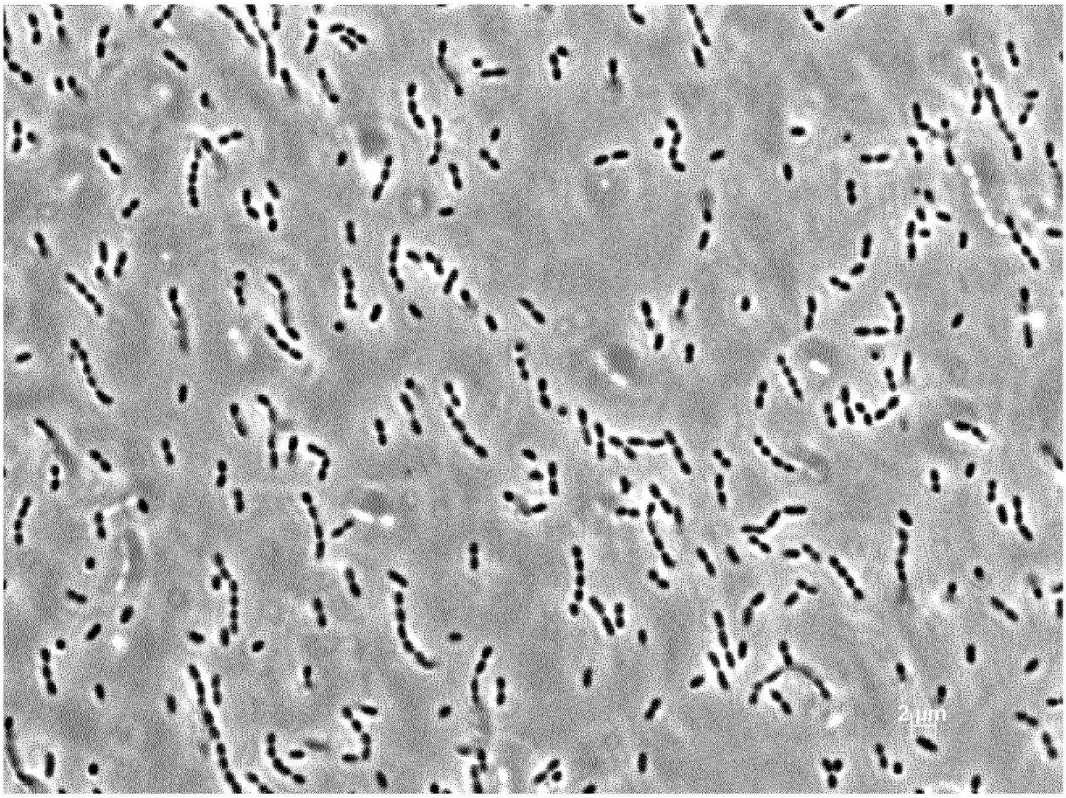


Fig.4

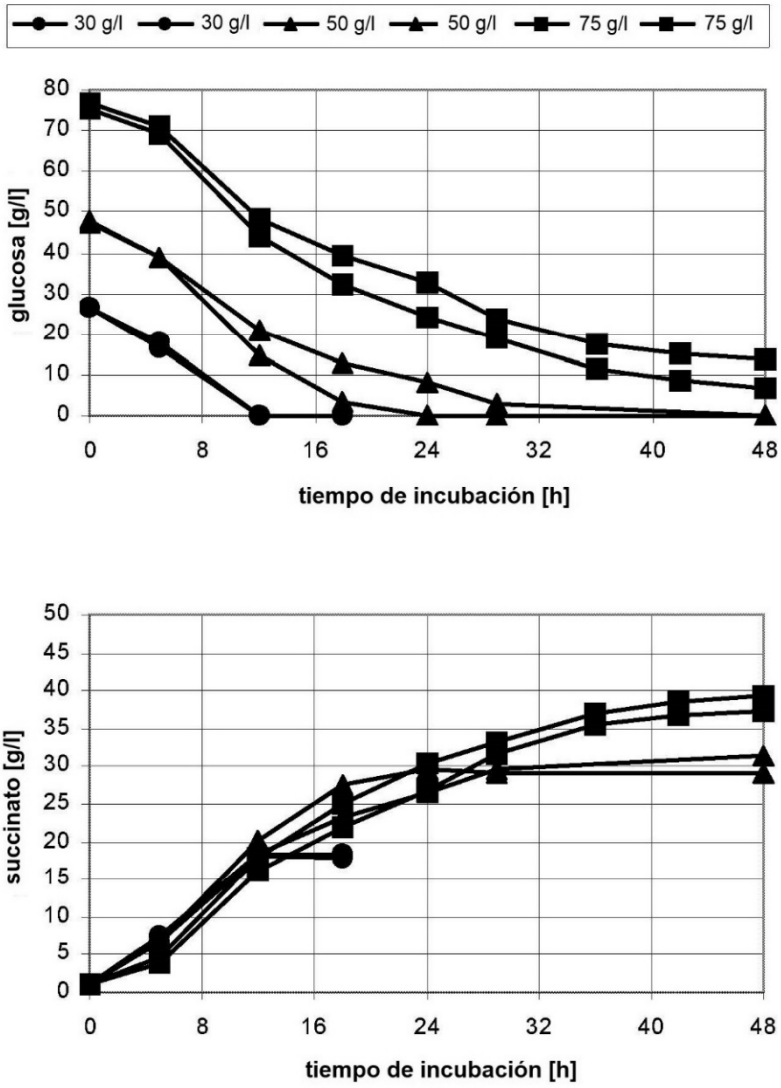

30 g/l
30 g/l
50 g/l
50 g/l
75 g/l
75 g/l
glucosa [g/l]
tiempo de incubación [h]
succinato [g/l]
tiempo de incubación [h]

Fig.5

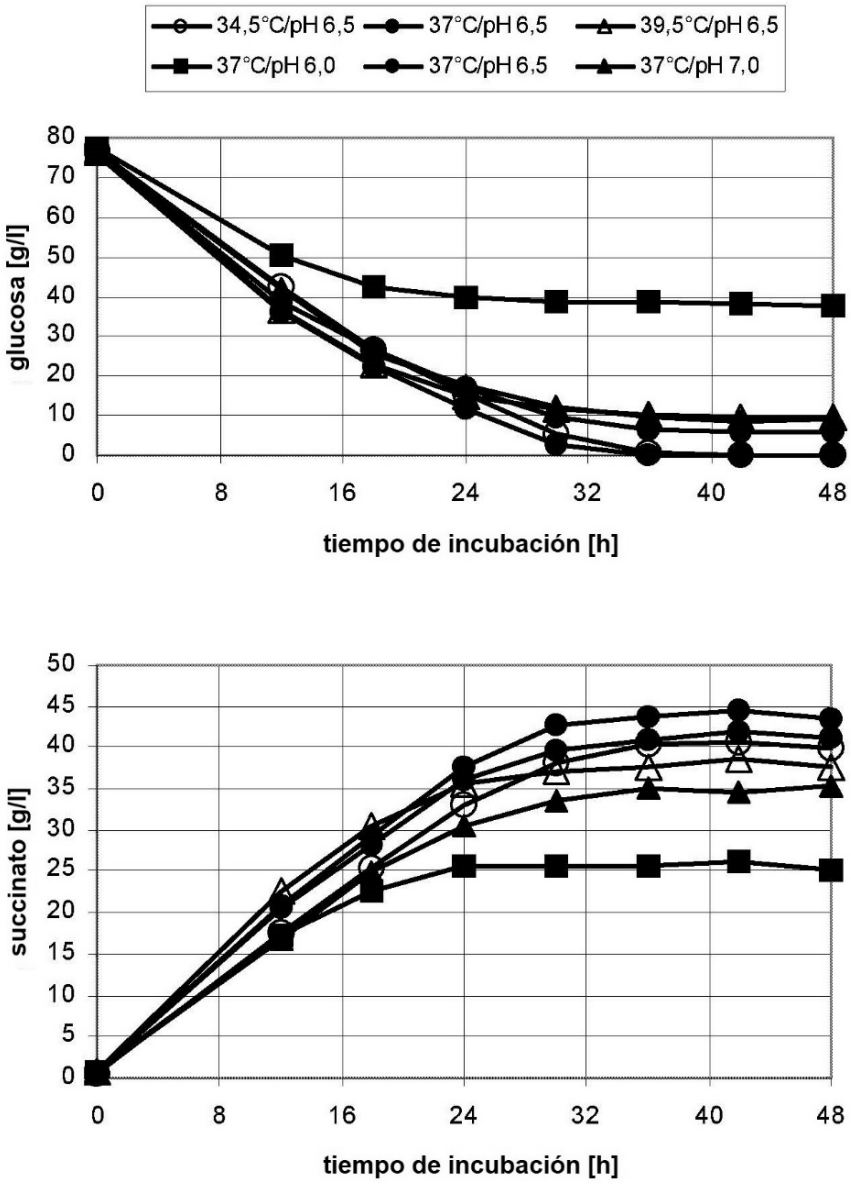

34,5°C/pH 6,5
37°C/pH 6,5
39,5°C/pH 6,5
37°C/pH 6,0
37°C/pH 6,5
37°C/pH 7,0
glucosa [g/l]
0
10
20
30
40
50
60
70
80
0
8
16
24
32
40
48
tiempo de incubación [h]
succinato [g/l]
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
0
8
16
24
32
40
48
tiempo de incubación [h]

Fig.6

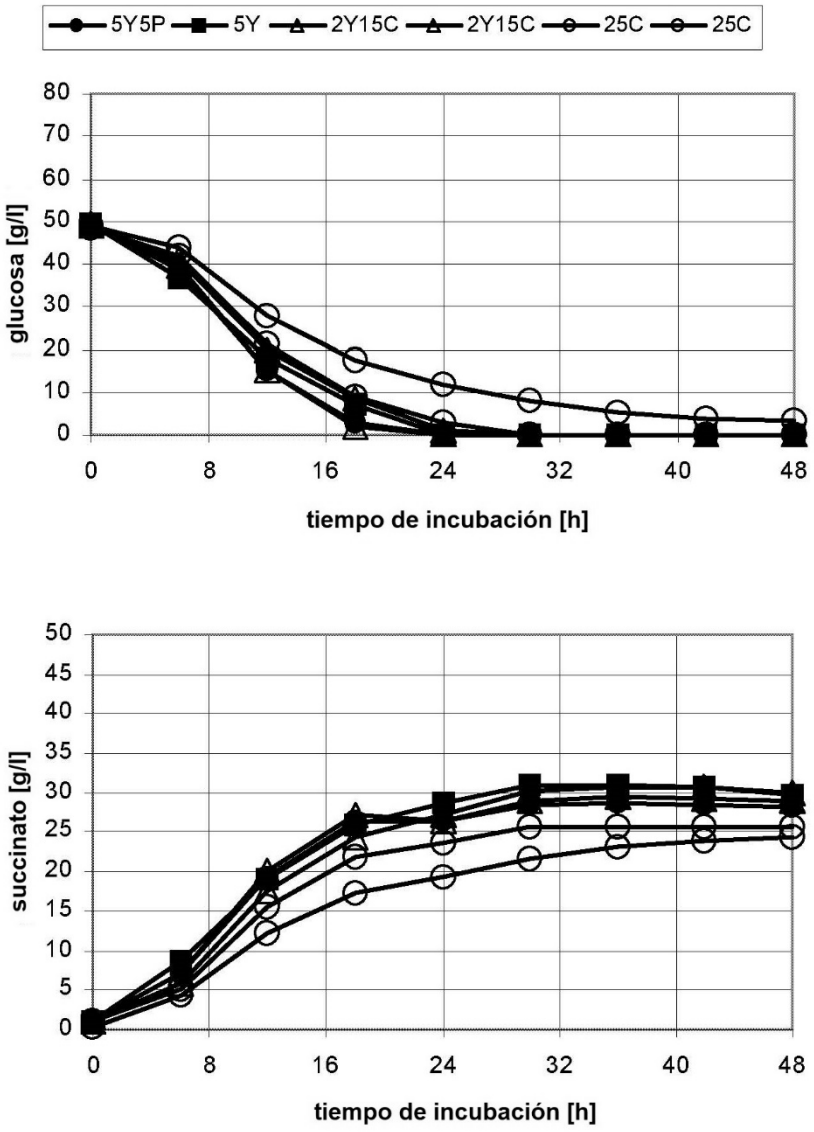

5Y5P
5Y
2Y15C
2Y15C
25C
25C
glucosa [g/l]
tiempo de incubación [h]
succinato [g/l]
tiempo de incubación [h]

Fig.7

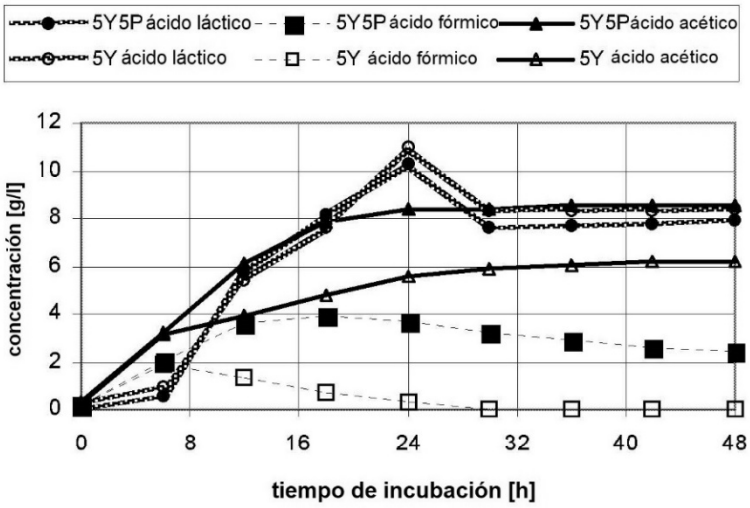

5Y5P ácido láctico
5Y5P ácido fórmico
5Y5P ácido acético
5Y ácido láctico
5Y ácido fórmico
5Y ácido acético
concentración [g/l]
tiempo de incubación [h]

Fig.8

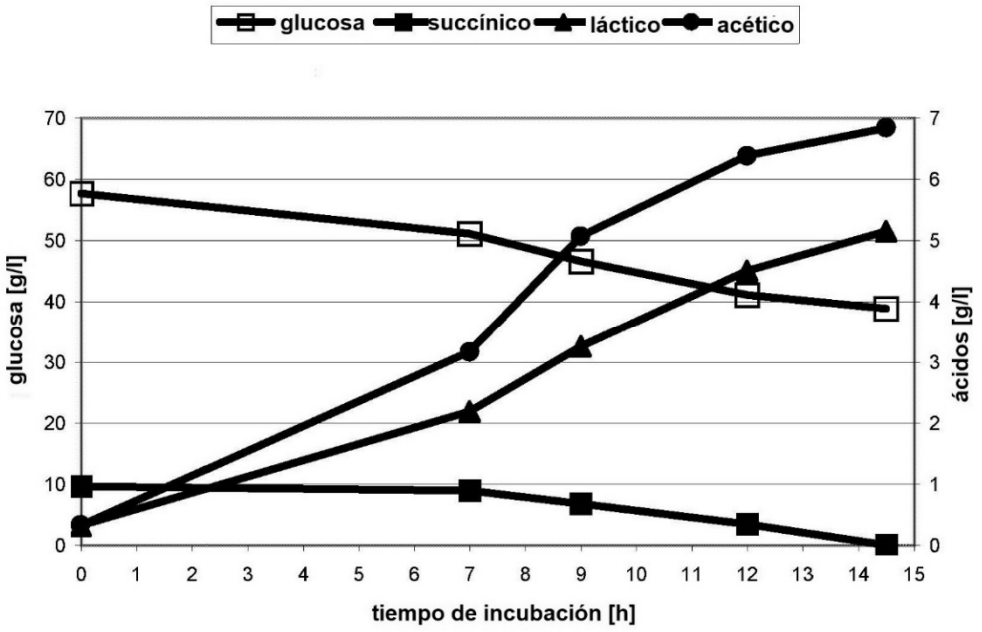

glucosa
succínico
láctico
acético
glucosa [g/l]
ácidos [g/l]
tiempo de incubación [h]

Fig.9

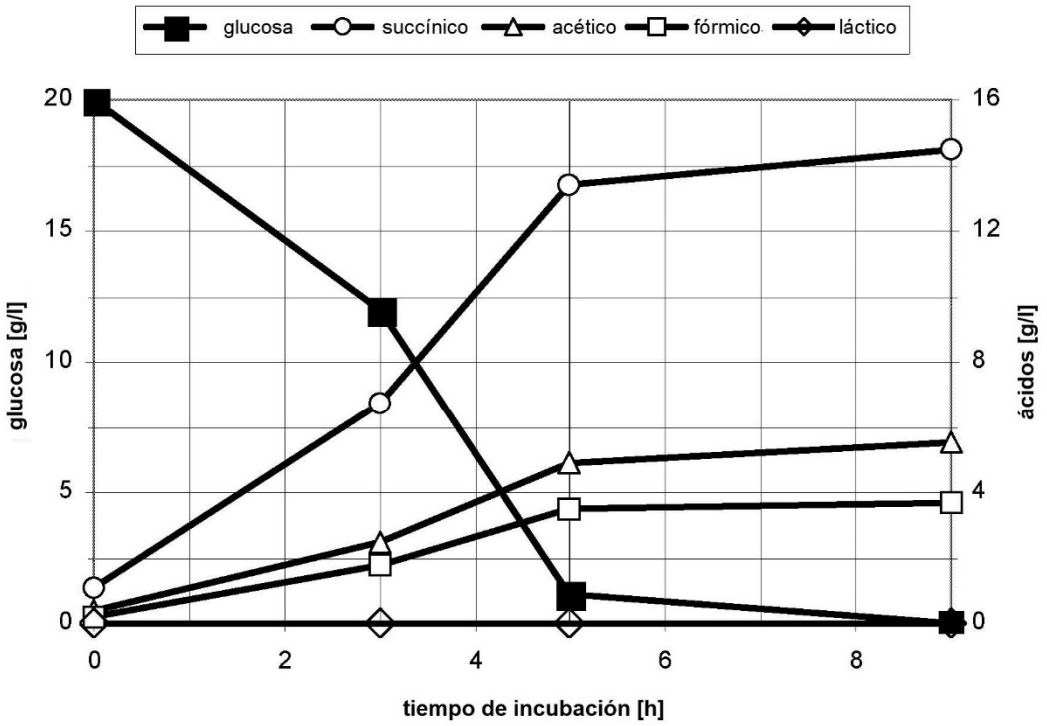

glucosa
succínico
acético
fórmico
láctico
20
15
10
5
0
16
12
8
4
0
0
2
4
6
8
glucosa [g/l]
ácidos [g/l]
tiempo de incubación [h]

Fig.10