

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 623 932**

51 Int. Cl.:

C12N 1/16 (2006.01)

C12P 7/46 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.05.2009 PCT/EP2009/056181**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.01.2010 WO10003728**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.05.2009 E 09779520 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.02.2017 EP 2297297**

54 Título: **Producción de ácido succínico por fermentación a bajo pH**

30 Prioridad:

08.07.2008 EP 08159891

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

12.07.2017

73 Titular/es:

DSM IP ASSETS B.V. (100.0%)

Het Overloon 1

6411 TE Heerlen, NL

72 Inventor/es:

**JANSEN, MICKEL LEONARDUS AUGUST y
VERWAAL, RENÉ**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 623 932 T3

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

DESCRIPCIÓN

Producción de ácido succínico por fermentación a bajo pH.

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de ácido succínico. En particular, se refiere a la producción de ácido succínico por fermentación de una levadura.

Antecedentes de la invención

10 Los ácidos dicarboxílicos, tales como ácido fumárico y ácido succínico, son compuestos importantes que se usan en la industria alimentaria para la preparación y conservación de los alimentos, en la industria médica para la formulación de productos médicos y otros usos industriales, tales como monómeros para (bio)polímeros. Para satisfacer la creciente necesidad de ácidos dicarboxílicos, se están desarrollando métodos de producción más eficaces y más rentables. Tradicionalmente, los ácidos dicarboxílicos se preparan por fermentación de bacterias, lo que puede producir grandes cantidades de ácidos dicarboxílicos. Esto se describe, por ejemplo, en la patente de EE.UU. 5.573.931 que describe un método para producir ácido succínico en altas concentraciones empleando una cepa bacteriana. Sin embargo, una desventaja principal asociada al uso de bacterias para producir ácidos dicarboxílicos es la formación de sal de ácido dicarboxílico. Si se usan bacterias, se requiere que se mantenga el pH durante la fermentación en el intervalo de pH 6-7, que es mayor que los valores de pKa de todos los ácidos dicarboxílicos. Como consecuencia, la mayoría de los ácidos se producirá en su forma de sal y se tendrán que convertir las sales en el ácido. Esto no es práctico o eficaz en procedimientos de producción a gran escala y eleva los costes de producción. También se han empleado microorganismos distintos de bacterias para la producción de ácidos orgánicos. La patente europea EP 0 424 384 describe un procedimiento aerobio para la producción de ácidos orgánicos por Rhizopus en un medio que contiene carbonato de calcio. La patente europea EP 1 183 385 describe células de levaduras genéticamente manipuladas con un fenotipo Crabtree negativo y conteniendo una molécula ácida de núcleo exógeno para la producción de ácido láctico. La patente internacional WO 2009011974 se centra en el logro genético de células fúngicas recombinantes para la producción de ácidos dicarboxílicos C4 tales como ácido fumárico, ácido málico, ácido succínico y ácido tartárico.

Descripción detallada

15 La presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de ácido succínico. El procedimiento comprende fermentar una levadura en presencia de un sustrato que contiene carbohidratos y bajas cantidades de oxígeno a un valor de pH que está por debajo del pKa de ácido succínico, en el que el oxígeno se suministra a una tasa de absorción de oxígeno específica que oscila entre 8 y 0,2 mmoles/g de peso seco de biomasa/hora.

20 El procedimiento de la presente invención permite altos rendimientos del producto de ácido succínico, permite un tratamiento aguas abajo más simple y es más rentable que los procedimientos existentes en los que se produce la sal que después se tiene que convertir en el ácido. Puesto que el ácido succínico presenta más de un valor de pKa, el pH debería estar por debajo del pKa más bajo del ácido succínico. El pH estará típicamente en el intervalo de pH 2,0 y pH 4,0. En una realización, el ácido succínico se produce a un valor de pH de 3,0. Otra ventaja es que debido al bajo pH el riesgo de contaminación se reduce.

25 La fase de producción de ácido va precedida preferiblemente por una fase de formación de biomasa para la producción óptima de biomasa. En la fase de formación de biomasa el pH está en el intervalo de pH 2 a pH 7. Preferiblemente, el pH está en el intervalo de pH 3 a pH 6, más preferiblemente, el pH está en el intervalo de pH 4 a pH 5.

30 El procedimiento según la presente invención es más rentable y puede conducir a un precio de coste un 30% inferior. Una de las razones es que los costes de valoración se reducen significativamente.

35 La levadura que se usa en el procedimiento puede ser cualquier levadura adecuada. Ejemplos adecuados de levaduras incluyen: *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Candida*, *Pichia* y *Yarrowia*, tales como especies de *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis*, *Candida sonorensis*, *Pichia stipidis* y *Yarrowia lipolytica*. En una realización, el microorganismo eucariota usado en el procedimiento es un *Saccharomyces cerevisiae*, un microorganismo que es un microorganismo industrialmente interesante usado extensamente.

40 En una realización preferida, la levadura en el procedimiento según la presente invención, es una levadura genéticamente modificada. Como se usa en la presente memoria, una levadura genéticamente modificada en el procedimiento según la presente invención, se define como una célula de levadura que contiene, o se transforma o se modifica de manera genética con, una secuencia de nucleótidos o polipéptido que no se encuentra en la naturaleza en la célula de la levadura o contiene copia o copias adicionales de una secuencia de ácidos nucleicos endógenos. Una célula de levadura natural se define en la presente memoria como la célula parenteral de la célula recombinante.

Preferiblemente, la levadura en el procedimiento según la presente invención es una levadura modificada de manera genética que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una enzima heteróloga seleccionada del grupo que consiste en una fosfoenolpiruvato carboxicinasas, fumarato reductasa y una fumarasa. Las realizaciones preferidas de las enzimas heterólogas son como se definen en la presente memoria a continuación.

5 El término "homólogo" cuando se usa para indicar la relación entre una determinada molécula de ácido nucleico (recombinante) o polipéptido y un determinado organismo huésped o célula huésped, se entiende que significa que por naturaleza la molécula de ácido nucleico o de polipéptido es producida por una célula huésped u organismos de la misma especie, preferiblemente de la misma variedad o cepa.

10 El término "heterólogo" cuando se usa con respecto a un ácido nucleico (ADN o ARN) o proteína se refiere a un ácido nucleico o proteína que no se encuentra en la naturaleza como parte del organismo, célula, genoma o secuencia de ADN o ARN en la que está presente o que se encuentra en una célula o posición o posiciones en el genoma o secuencia de ADN o ARN que difiere de aquélla en la que se encuentra en la naturaleza. Los ácidos nucleicos o proteínas, heterólogos, no son endógenos a la célula en la que se introducen, pero han sido obtenidos a partir de otra célula o se han producido de manera sintética o de manera recombinante.

15 Preferiblemente, la levadura genéticamente modificada comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una fosfoenolpiruvato carboxicinasas. La FEP carboxicinasas (EC 4.1.1.49) es preferiblemente una enzima heteróloga, preferiblemente procedente de bacterias, más preferiblemente la enzima con la actividad de la FEP carboxicinasas procede de *Escherichia coli*, *Mannheimia sp.*, *Actinobacillus sp.*, o *Anaerobiospirillum sp.*, más preferiblemente *Mannheimia succiniciproducens* o *Actinobacillus succinogenes*. En una realización, la FEP carboxicinasas procede de *Actinobacillus succinogenes* (PCKa), en la que el PCKa ha sido modificado preferiblemente para reemplazar EGY en la posición 120-122 con una secuencia de aminoácidos DAF. Preferiblemente, una célula de levadura en el procedimiento según la presente invención se modifica de manera genética con una FEP carboxicinasas que tiene al menos 80, 85, 90, 95, 99 ó 100% de identidad de secuencias con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 6.

25 En otra realización preferida, una levadura genéticamente modificada en el procedimiento según la presente invención comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una fumarato reductasa. Preferiblemente, la fumarato reductasa es una enzima heteróloga, preferiblemente una fumarato reductasa dependiente de NAD(H), que puede proceder de cualquier origen adecuado, por ejemplo, bacterias, hongos, protozoos o plantas. Preferiblemente, una levadura en el procedimiento según la invención comprende una fumarato reductasa dependiente de NAD(H) heteróloga, preferiblemente procedente de una *Trypanosoma sp.*, por ejemplo, una *Trypanosoma brucei*. En una realización preferida, la secuencia de nucleótidos que codifica una fumarato reductasa dependiente de NAD(H) se expresa en el citosol. En el caso de que la secuencia de nucleótidos que codifica una fumarato reductasa dependiente de NAD(H) comprenda una señal de localización peroxisomal o mitocondrial, puede ser esencial modificar o suprimir una serie de aminoácidos (y correspondientes secuencias de nucleótidos en la secuencia de nucleótidos codificadora) para evitar la localización peroxisomal o mitocondrial de la enzima. La presencia de una señal de localización peroxisomal puede determinarse, por ejemplo, por el método descrito por Schlüter et al, Nucleic acid Research 2.007, 35, D815-D822. Preferiblemente, una célula de levadura en el procedimiento según la presente invención se modifica de manera genética con una fumarato reductasa dependiente de NAD(H), que tiene al menos 80, 85, 90, 95, 99 ó 100% de identidad de secuencias con la SEC ID N° 7.

40 En otra realización preferida, una levadura genéticamente modificada en el procedimiento según la presente invención comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una fumarasa, que puede ser una enzima heteróloga u homóloga. Una secuencia de nucleótidos que codifique una fumarasa heteróloga puede proceder de cualquier origen adecuado, preferiblemente de origen microbiano, preferiblemente de una levadura, por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae* o un hongo filamentoso, por ejemplo, *Rhizopus oryzae*. Preferiblemente, una levadura en el procedimiento según la presente invención sobreexpresa una secuencia de nucleótidos codificadora de una fumarasa que presenta al menos 70%, preferiblemente al menos 75, 80, 85, 90, 92, 94, 95, 96, 97, 98 ó 99% o 100% de identidad de secuencias con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 8.

50 En otra realización preferida, una levadura genéticamente modificada en el procedimiento según la presente invención comprende además una secuencia de nucleótidos que codifica una malato deshidrogenasa (MDH), que es activa en el citosol en la expresión de la secuencia de nucleótidos. Preferiblemente, la MDH carece de señal de localización peroxisomal o mitocondrial para localizar la enzima en el citosol. Una MDH citosólica puede ser cualquier malato deshidrogenasa homóloga o heteróloga, adecuada. Preferiblemente, una célula de levadura comprende una secuencia de nucleótidos codificadora de una malato deshidrogenasa que presenta al menos 70%, preferiblemente al menos 75, 80, 85, 90, 92, 94, 95, 96, 97, 98, 99% de identidad de secuencias con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 9.

55 En otra realización, una levadura genéticamente modificada en el procedimiento según la invención comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína transportadora de ácido dicarboxílico, preferiblemente una proteína transportadora de ácido málico (MAE). Una proteína transportadora de ácido dicarboxílico puede ser una proteína homóloga o heteróloga. Preferiblemente, la proteína transportadora de ácido dicarboxílico es una proteína heteróloga. Una proteína transportadora de ácido dicarboxílico puede proceder de cualquier organismo adecuado, preferiblemente de *Schizosaccharomyces pombe*. Preferiblemente, una proteína transportadora de ácido

dicarboxílico es una proteína transportadora de ácido málico (MAE) que presenta al menos 80, 85, 90, 95 o 99% o 100% de identidad de secuencias con la SEC ID N° 10.

5 Preferiblemente, la levadura usada en el procedimiento según la presente invención, es una levadura genéticamente modificada que comprende una FEP-carboxicinas heteróloga, una fumarato reductasa dependiente de NAD(P)H heteróloga, una fumarasa heteróloga, una proteína transportadora de ácido málico heteróloga y una malato deshidrogenasa citosólica. Las realizaciones preferidas de estas enzimas son como se definieron en la presente memoria anteriormente.

10 Identidad de secuencias se define en la presente memoria como una relación entre dos o más secuencias de aminoácidos (polipéptido o proteína) o dos o más secuencias de ácidos nucleicos (polinucleótido), cuando se determina por comparación de las secuencias. Normalmente, las identidades o similitudes de secuencias se comparan por la longitud completa de las secuencias comparadas. En la técnica, "identidad" también significa el grado de relación de las secuencias entre secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos, como puede ser el caso, cuando se determina por la coincidencia entre cadenas de dichas secuencias.

15 Los métodos preferidos para determinar la identidad se diseñan para proporcionar la coincidencia mayor entre las secuencias ensayadas. Los métodos para determinar la identidad y similitud se codifican en programas informáticos disponibles al público. Los métodos de programas informáticos preferidos para determinar la identidad y similitud entre dos secuencias incluyen BLASTP y BLASTN, disponibles al público en NCBI y otras fuentes (BLAST Manual, Altschul, S., et al., NCBI NLM NIH Bethesda, MD 20894). Los parámetros preferidos para comparación de
20 secuencias de aminoácidos usando BLASTP son abertura de huecos 11.0, extensión de huecos 1, matriz Blosum 62.

25 El término "ácido nucleico" como se usa en la presente memoria, incluye referencia a un polímero de desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, es decir, un polinucleótido, en forma mono o bicatenaria, y a menos que se limite de otro modo, incluye análogos conocidos con la naturaleza esencial de nucleótidos naturales en que se hibridan a ácidos nucleicos monocatenarios de una manera similar a nucleótidos que se encuentran en la naturaleza (por ej., ácidos nucleicos peptídicos). Un polinucleótido puede ser de longitud completa o una subsecuencia de un gen estructural o regulador natural o heterólogo. A menos que se indique de otro modo, el término incluye referencia a la secuencia especificada así como la secuencia complementaria de la misma.

30 En una realización preferida, la levadura en el procedimiento según la invención sobreexpresa las secuencias de nucleótidos que codifican cualquiera de las enzimas como se definió en la presente memoria anteriormente. Hay varios medios disponibles en la técnica para la sobreexpresión de secuencias de nucleótidos que codifican enzimas en una levadura en el procedimiento de la invención. En particular, una secuencia de nucleótidos que codifica una enzima puede sobreexpresarse aumentando el número de copias del gen codificador de la enzima en la célula, por
35 ej., integrando copias adicionales del gen en el genoma de la célula, expresando el gen de un vector centromérico, de un vector de expresión de multicopia episomal o introduciendo un vector de expresión (episomal) que comprende múltiples copias del gen. Preferiblemente, la sobreexpresión de la enzima se consigue con un activador constitutivo (fuerte).

40 El sustrato que contiene carbohidrato puede ser cualquier sustrato que contenga carbohidrato que incluya melaza, jugo de caña de azúcar, pentosas y hexosas, tales como glucosa, fructosa, xilosa, arabinosa. Preferiblemente, el sustrato que contiene carbohidrato es un sustrato que contiene glucosa, tal como maltosa, sacarosa, glucosa o un jarabe de glucosa. El contenido en carbohidrato del sustrato que contiene carbohidrato es preferiblemente mayor que 50% p/p, más preferiblemente mayor que 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80% p/p, lo más preferiblemente mayor que 85%, 90%, 95% o 99% p/p sobre la base de contenido en materia seca.

45 El procedimiento según la presente invención, comprende preferiblemente fermentar una levadura en condiciones limitadas de carbono (C). Condiciones limitadas de C se definen en la presente memoria como una concentración de carbohidrato disuelto por debajo de 1 g/l, preferiblemente por debajo de 0,9 g/l, 0,8 o por debajo de 0,5 g/l de carbohidrato disuelto. Se encontró que fermentar levadura en condiciones limitadas de C daba como resultado un rendimiento aumentado de ácido succínico cuando se compara con condiciones no limitadas de C.

50 El oxígeno para la fermentación puede suministrarse en cualquier forma adecuada. En una realización, el oxígeno se suministra en forma de aire. El oxígeno debería suministrarse en cantidades bajas. Esto se refleja en la tasa de absorción de oxígeno (TAO) y/o la tasa de absorción de oxígeno específica (qO_2) del año. La TAO en el presente procedimiento es menor que aproximadamente 8,0 mmoles de oxígeno//hora, preferiblemente menor que aproximadamente 5,0; 4,0; 3,0 ó 2,0 mmoles de oxígeno//hora, más preferiblemente menor que aproximadamente 1,0 ó 0,5 mmoles de oxígeno//hora, preferiblemente mayor que 0,01 mmoles de oxígeno//hora.

55 La tasa de absorción de oxígeno específica (qO_2) en el procedimiento de la invención oscila entre 8 mmoles de oxígeno/g de peso seco de biomasa /hora y 0,5 mmoles de oxígeno/g de peso seco de biomasa /hora, preferiblemente entre 5, 4, 3 ó 2 mmoles de oxígeno/g de biomasa/hora y aproximadamente 0,4; 0,3 ó 0,2 mmoles de oxígeno/g de biomasa/hora.

El procedimiento según la presente invención puede llevarse a cabo en modo discontinuo, lote alimentado o modo continuo. Estos modos de fermentación son conocidos para el experto en la materia. Dependiendo del modo de fermentación, la concentración de biomasa durante la fermentación puede variar más o menos durante la fermentación. En modo discontinuo y modo de lote alimentado la concentración de biomasa normalmente aumenta. Por consiguiente, la tasa de absorción de oxígeno específica normalmente disminuye en un modo discontinuo y de lote alimentado.

La temperatura del procedimiento está típicamente entre 10 y 40 grados C, preferiblemente entre 20 y 35 grados C, más preferiblemente entre 30 y 35 grados C.

En una realización del procedimiento según la invención, está presente un donador de electrones extra además del sustrato que contiene carbohidrato. El donador de electrones extra es preferiblemente un donador de electrones orgánico. Ejemplos adecuados de donadores de electrones orgánicos incluyen glicerol, formiato y polioles, tales como manitol, sorbitol y xilitol.

Figuras

Figura 1. Efecto de la TAO aplicada en la producción de ácido succínico después de 90 h a pH 3.

15 Ejemplos

Ejemplo 1. Producción de ácido succínico por *Saccharomyces cerevisiae*.

1.1. Construcción cepa de levadura.

1.1.1. Construcción de construcciones de expresión.

Se creó la construcción de expresión pGBS414PPK-3 después de una restricción *Bam*HI/*Not*I del vector de expresión pRS414 de *S. cerevisiae* (Sirkoski R. S. y Hieter P, Genetics, 1.989, 122 (1): 19-27) y ligando con posterioridad en este vector un fragmento de restricción *Bam*HI/*Not*I que consiste en la construcción génica sintética de fosfoenolpiruvato carboxinasa (origen *Actinobacillus succinogenes*) (SEC ID N° 1). Se usó la mezcla de ligadura para transformación de TOP10 de *E. coli* (Invitrogen) dando como resultado la construcción de expresión de levadura pGBS414PPK-1. Con posterioridad, se restringió pGBK414PPK-1 con *Asc*I y *Not*I. Para crear pGBS414PPK-3, se ligó un fragmento de restricción *Asc*I/*Not*I que consistía en fumarato reductasa glicosomal de construcción génica sintética *T. brucei* (FRDg) (SEC ID N° 2) al vector pGBS414PPK-1 restringido. Se usó la mezcla de ligadura para transformación de TOP10 de *E. coli* (Invitrogen) dando como resultado la construcción de expresión de levadura pGBS414PPK-3.

Se creó la construcción de expresión pGBS415FUM-3 después de una restricción *Bam*HI/*Not*I del vector de expresión pRS415 de *S. cerevisiae* (Sirkoski R. S. y Hieter P, Genetics, 1.989, 122 (1): 19-27) y ligando con posterioridad en este vector un fragmento de restricción *Bam*HI/*Not*I que consistía en la construcción génica sintética de fumarasa (origen *Rhizopus oryzae*) (SEC ID N° 3). Se usó la mezcla de ligadura para transformación de TOP10 de *E. coli* (Invitrogen) dando como resultado la construcción de expresión de levadura pGBS415FUM-1. Con posterioridad, se restringió pGBK415FUM-1 con *Asc*I y *Not*I. Para crear pGBS415FUM-3, se ligó un fragmento de restricción *Asc*I/*Not*I que consistía en malato deshidrogenasa peroxisomal de construcción génica sintética *S. cerevisiae* (*MDH3*) (SEC ID N° 4) al vector pGBS415FUM-1 restringido. Se usó la mezcla de ligadura para transformación de TOP10 de *E. coli* (Invitrogen) dando como resultado la construcción de expresión de levadura pGBS415FUM-3.

Se creó la construcción de expresión pGBS416MAE-1 después de una restricción *Bam*HI/*Not*I del vector de expresión pRS416 de *S. cerevisiae* (Sirkoski R. S. y Hieter P, Genetics, 1.989, 122 (1): 19-27) y ligando con posterioridad en este vector un fragmento de restricción *Bam*HI/*Not*I que consistía en la construcción génica sintética de transportador de malato de *Schizosaccharomyces pombe* (SEC ID N° 5). Se usó la mezcla de ligadura para transformación de TOP10 de *E. coli* (Invitrogen) dando como resultado la construcción de expresión de levadura pGBS416MAE-1.

1.1.2. Construcción cepa de *S. cerevisiae*.

Se transformaron los plásmidos pGBS414PPK-3, pGBS415FUM-3 y pGBS416MAE-1 (descritos en 1.1.) por electroporación en cepa RWB064 de *S. cerevisiae* (*MATA ura3-52 leu2-112 trp1-289 adh1::lox adh2::lox gpd1::Kanlox*) para crear cepa SUC-200, sobreexpresando PCKa, MDH3, FUMR, FRDg y SpMAE1. Se optimizaron los pares de codones de todos los genes para expresión en *S. cerevisiae* según la patente internacional WO2008/000632.

1.2. Producción de ácido succínico *S. cerevisiae* a pH bajo y condiciones limitadas de oxígeno.

Se cultivó la cepa de levadura SUC-200 (*MATA ura3-52 leu2-112 trp1-289 adh1::lox adh2::lox gpd1::Kanlox*, que sobreexpresaba PCKa, MDH3, FUMR, FRDg y SpMAE1), en un matraz para agitación (2 x 300 ml) durante 3 días a

ES 2 623 932 T3

30°C y 23 rad/s (220 rpm). El medio se basaba en Verduyn (Verduyn et. al., 1.992, Yeast 8, 501-517), pero se hicieron modificaciones en la fuente de carbono y nitrógeno como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Composición del medio de matraz para agitación de precultivo.

| Compuesto | Concentración (g/l) |
|---------------------------|---------------------|
| $C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$ | 20,0 |
| $(NH_2)_2CO$ | 2,3 |
| KH_2PO_4 | 3,0 |
| $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ | 0,5 |
| | 1 |
| | 1 |

5

^aDisolución de vitamina

| Componente | Fórmula | Concentración (g/kg) |
|---------------------------------|-------------------------------------|----------------------|
| Biotina (D-) | $C_{10}H_{16}N_2O_3S$ | 0,05 |
| D(+) Pantotenato de Ca | $C_{18}H_{32}CaN_2O_{10}$ | 1,00 |
| Ácido nicotínico | $C_6H_5NO_2$ | 1,00 |
| Mio-inositol | $C_6H_{12}O_6$ | 25,00 |
| Cloruro hidrocloreto de tiamina | $C_{12}H_{18}Cl_2N_4OS \cdot xH_2O$ | 1,00 |
| Hidrocloreto de piridoxol | $C_8H_{12}ClNO_3$ | 1,00 |
| ácido p-aminobenzoico | $C_7H_7NO_2$ | 0,20 |

^bDisolución de elementos traza

| Fórmula | Concentración (g/kg) |
|--|----------------------|
| $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2 H_2O$ (EDTA) | 15,00 |
| $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ | 4,50 |
| $MnCl_2 \cdot 2 H_2O$ | 0,84 |
| $CoCl_2 \cdot 6 H_2O$ | 0,30 |
| $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$ | 0,30 |
| $Na_2MoO_4 \cdot 2 H_2O$ | 0,40 |
| $CaCl_2 \cdot 2 H_2O$ | 4,50 |
| $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ | 3,00 |
| H_3BO_3 | 1,00 |
| KI | 0,10 |

Con posterioridad, se transfirió el contenido de los matraces para agitación a un fermentador de 10 l (Peso de partida 6 kg), que contenía el medio siguiente:

5 Tabla 2. Composición del medio de fermentación principal.

| Materia prima | Fórmula | Concentración (g/l) |
|-------------------------------|-----------------------|---------------------|
| Sulfato de amonio | $(NH_4)_2SO_4$ | 2,5 |
| Dihidrogenofosfato de potasio | KH_2PO_4 | 3,0 |
| Sulfato de magnesio | $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ | 0,5 |
| Disolución de elementos traza | | 1 |
| Disolución de vitamina | | 1 |

10 Se controló el pH a 3,0 por adición de KOH 6 N. Se controló la temperatura a 30°C. Se mantuvo limitada la concentración de glucosa (< 1 g/l) controlando la adición de alimentación al fermentador. Se aplicaron diferentes tasas de absorción de oxígeno (TAO) a la fermentación, que dio como resultado limitación de oxígeno (Figura 1). Se aplicaron 0,33 vvm de flujo de gas total, incluyendo CO₂ al 10% para suministrar suficiente CO₂ para la producción eficaz de ácido succínico.

Los resultados de diferentes TAO aplicadas en la producción de ácido succínico se muestran en la Figura 1. Se requirió una cantidad mínima de aireación para mantener la producción de ácido succínico a un pH de 3. Una TAO por encima de 5 mmoles/l/h dio como resultado una producción de ácido succínico inferior.

15 Durante el cultivo de 90 horas, tuvo lugar crecimiento para una concentración de biomasa típica de 8 g de peso seco/l. Por consiguiente, la tasa de absorción de oxígeno específica (qO_2) disminuyó de manera constante durante la fermentación. Una TAO de 10 mmoles/l/h aplicada en una fermentación se correlaciona con una disminución de qO_2 de 10 a 1,25 mmoles/g de peso seco de biomasa/h y una TAO de 1 mmol/l/h correlacionado con una disminución de qO_2 de 1 a 0,1 mmoles/g de peso seco de biomasa/h.

REIVINDICACIONES

1. El procedimiento para la preparación de ácido succínico, que comprende fermentar una levadura en presencia de un sustrato que contiene carbohidratos y bajas cantidades de oxígeno a un valor de pH que está por debajo del pKa más bajo de ácido succínico, en el que el oxígeno se suministra a una tasa de absorción de oxígeno específica que oscila entre 8 y 0,2 mmoles de oxígeno/g de peso seco de biomasa/hora.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el pH está en el intervalo de pH 2,0 a pH 4,0.
3. Procedimiento según las reivindicaciones 1 ó 2, en el que el pH es 3,0.
4. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende fermentar la levadura en condiciones de carbono limitadas.
5. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en presencia de un donador de electrones extra.
6. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la levadura es una *Saccharomyces cerevisiae*.
7. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la levadura es una levadura genéticamente modificada.
8. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que la levadura modificada de manera genética comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una enzima heteróloga seleccionada del grupo que consiste en una fosfoenolpiruvato carboxicinasas, fumarato reductasa y una fumarasa.

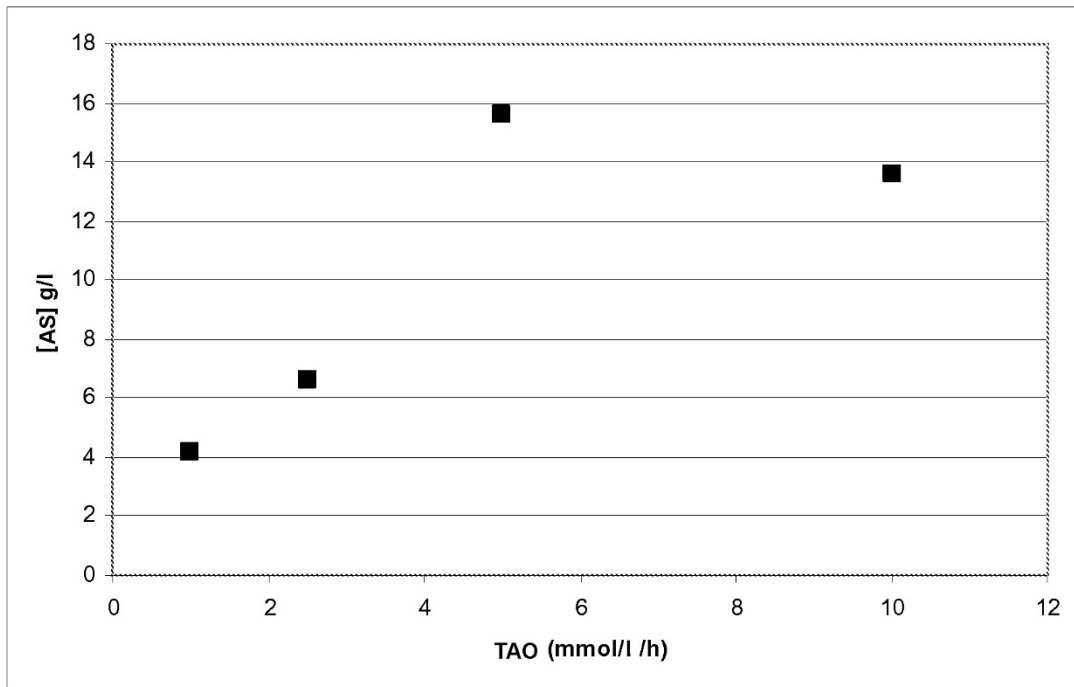


Fig. 1