

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 587 402**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

C12P 7/46 (2006.01)

C12P 17/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.08.2008** **PCT/EP2008/006714**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.02.2009** **WO09024294**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.08.2008** **E 08785561 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.05.2016** **EP 2185682**

54 Título: **Miembro productor de ácido carboxílico de la familia Pasteurellaceae**

30 Prioridad:

17.08.2007 EP 07114574

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

24.10.2016

73 Titular/es:

**BASF SE (100.0%)
CARL-BOSCH-STR. 38
67056 LUDWIGSHAFEN AM RHEIN, DE**

72 Inventor/es:

**SCHOLTEN, EDZARD;
DAEGELE, DIRK;
HAEFNER, STEFAN y
SCHRÖDER, HARTWIG**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 587 402 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

Miembro productor de ácido carboxílico de la familia *Pasteurellaceae*

La presente invención se refiere a una nueva cepa bacteriana denominada DD1, que tiene la capacidad para producir ácidos orgánicos, en particular ácido succínico (AS), que originalmente se aisló del rumen bovino, y es capaz de utilizar glicerol como fuente de carbono; así como a procedimientos para producir ácidos orgánicos, en particular, ácido succínico usando 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 adicionales de bajo peso molecular, 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 gram negativo, mesofílico y capnófilico no móvil y no formador de esporas. El análisis filogenético basado en la secuencia de ARNr de 16S y el análisis fisiológico indicó que la cepa pertenece al género *Mannheimia*, como una nueva especie, y se ha denominado *Mannheimia succiniciproducens* MBEL55E. En condiciones de CO₂ al 100 %, crece bien en el intervalo de pH de 6,0-7,5 y produce ácido succínico, ácido acético y ácido fórmico a una proporción constante de 2:1:1. Cuando se cultivó *M. succiniciproducens* MBEL55E de manera anaerobia con saturación de CO₂ 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 glicérols (TAG), llega 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 glucosa (Lee y col., 2001). Sin embargo, el rendimiento espaciotemporal obtenido con el glicerol fue sustancialmente menor que con 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 a productos de fermentación. La *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 Gonzalez 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*, tales 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 comunicado la conversión de glicerol a ácido succínico usando *Anaerobiospirillum succiniciproducens* (Lee et al. 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 suministrando 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 HCO₃ como fuente de CO₂ (Peters-Wendisch, PG y col.). Por lo tanto, pueden aplicarse fuentes de hidrogenocarbonato, tales como NaHCO₃, KHCO₃, NH₄HCO₃ y similares a los medios de cultivo para mejorar la disponibilidad de HCO₃ 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 HCO₃⁻.

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 funciona la combinación de sacáridos con glicerol en un organismo anaerobio productor de ácido succínico (Lee y col., 2001), sin embargo, sin alcanzar títulos de ácido succínico más allá de 28 g/l.

Hay, 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.

5 **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.

10 **Breve descripción de las figuras**

- Figura 1 muestra el árbol filogenético para DD1
 Figura 2 muestra la secuencia de ADNr 16S (SEQ ID NO: 1) de DD1;
 Figura 3 muestra la secuencia de ADNr 23S (SEQ ID NO: 2) de DD1; su alineamiento con las seis secuencias individuales correspondientes de "*M. succiniciproducens*" MBEL55E; donde las diferencias entre la secuencia de DD1 (parte inferior) y las secuencias de MBEL55E se encuentran resaltadas y se muestran en el Anexo 1 separado;
 Figura 4 muestra una imagen de microscopía óptica de DD1;
 Figura 5 muestra cultivos discontinuos controlados por NH₄OH de DD1 a diferentes concentraciones iniciales de glucosa;
 Figura 6 muestra cultivos discontinuos controlados por NH₄OH de DD1 a diferentes valores de temperatura y pH;
 Figura 7 muestra cultivos discontinuos controlados por NH₄OH de DD1. Las figuras representan niveles iniciales [g/l] de extracto de levadura (Y), peptona (P) y licor de maíz fermentado (C).
 Figura 8 muestra subproductos obtenidos en cultivos discontinuos de DD1 controlados por NH₄OH 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 CO₂ con glucosa, tal como se describe por Lee y col., 2002a y 2002b.

Descripción detallada de la invención

- 30 Una primera realización de la invención se refiere a una cepa bacteriana, denominada DD1, que puede aislarse del rumen bovino, y es capaz de utilizar glicerol (incluyendo glicerol en bruto) como fuente de carbono.

Preferentemente, dicha cepa tiene la capacidad de producir ácido succínico a partir de glicerol (incluyendo glicerol en bruto), en particular, en condiciones anaerobias.

- 35 En particular, la nueva cepa tiene un ADNr 16S de SEQ ID NO: 1 o una secuencia que muestra una homología de secuencia de al menos el 96, 97, 98, 99 o 99,9 % y/o un ADNr 23S de SEQ ID NO: 3 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, tal 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.sourceforge.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

- 45 En el Anexo 1 se muestra un alineamiento de la secuencia de 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 de ADNr 23S de MBEL55E. La secuencia de DD1 (véase también la SEQ ID NO: 3) representa la información de secuencia obtenida mediante secuenciación del ADNr 23S amplificado por la PCR de DD1. Los experimentos de secuenciación dieron como resultado una información de secuencia unívoca que indicaba que puede usarse la información de secuencia de 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. Las diferencias de secuencia significativas específicas adicionales 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 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;
- 5 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;
- 10 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) no utilización de xilitol, inositol y sorbitol;
- j) crecimiento en condiciones tanto aerobias como anaerobias;
- k) crecimiento a concentraciones iniciales de glucosa de 75 g/l o más;
- l) tolerancia al amoníaco.

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

Por ejemplo, se analizó adicionalmente a DD1 respecto de la capacidad para metabolizar conjuntamente un sacárido y el poliol glicerol. Se observó que DD1 es capaz de metabolizar conjuntamente maltosa y glicerol, dando como resultado la producción de biomasa, la formación de ácido succínico y la utilización simultánea de maltosa y glicerol. El término "ácido" (en el contexto de ácidos orgánicos mono o dicarboxílicos, tal como se citan en el presente documento, por ejemplo, ácido acético, láctico y succínico) tiene que entenderse en su sentido más amplio y también abarca sales del mismo, tales 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.

- 20 La expresión "glicerol en bruto" debe entenderse como una corriente que contiene glicerol no tratado tal como se obtiene en procedimientos en las 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 bacteriana DD1 depositada en el DSMZ y que tiene el número de depósito DSM 18541. Las variantes y mutantes de DD1, que no forman parte de la presente invención, 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 96, 97, 98, 99 o 99,9 % y/o un ADNr 23S de SEQ ID NO: 3 o una secuencia que muestra una homología de secuencia de al menos el 95, 96, 97, 98, 99 o 99,9 %. Las variantes o mutantes de dicha cepa DD1, que no forman parte de la presente invención, pueden tener un ADNr 23S diferente de aquel de la SEQ ID NO: 2, a la vez que mantiene al menos una de las diferencias de secuencia discutidas anteriormente que distingue a la secuencia de ADNr 23S de la de la cepa MBEL55E. A modo de ejemplo, la inserción de 132 pb está ausente en dichas variantes o mutantes también, 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 a 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.

- 45 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/g. Por ejemplo, pueden convertirse 28 g/l de glicerol en hasta aproximadamente 40 o hasta aproximadamente 35 g/l de ácido succínico.

- 50 De acuerdo con otra realización más, 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 a ácido succínico con un rendimiento de productividad específica de al menos 0,6 g gDCW⁻¹ h⁻¹ de ácido succínico, o de al menos 0,65, de al menos 0,7 g gDCW⁻¹ h⁻¹, de al menos 0,75 g gDCW⁻¹ h⁻¹, o de al menos 0,77 g gDCW⁻¹ h⁻¹ de ácido succínico.

- 55 De acuerdo con otra realización más, 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 a ácido succínico con un rendimiento espaciotemporal 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 entre sacarosa, maltosa, D-fructosa, D-glucosa, D-xilosa, L-arabinosa, D-galactosa, D-manosa, y/o glicerol a ácido succínico con un rendimiento espaciotemporal 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).

- 5 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 a ácido succínico con un rendimiento de productividad específica de al menos 0,6 g gDCW⁻¹ h⁻¹ o de al menos 0,65 o de al menos 0,7 g gDCW⁻¹ h⁻¹ de ácido succínico, o de al menos 0,77 g gDCW⁻¹ h⁻¹ de ácido succínico, y con un rendimiento espaciotemporal 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 tal como se han definido anteriormente, la fuente de carbono es glicerol o una mezcla de glicerol y al menos una fuente de carbono adicional seleccionada entre sacarosa, maltosa, D-fructosa, D-galactosa, D-manosa, D-glucosa, D-xilosa, y L-arabinosa.

- 15 Los diferentes parámetros de rendimiento tal como se definen en el presente documento ("rendimiento" o YP/S; "rendimiento de productividad específica"; o rendimiento espaciotemporal (STY)) se conocen bien en la técnica y se determinan tal como se describe, por ejemplo, por Son 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.

- 20 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 en forma de g de producto por g de DCW por h (es decir, g gDCW⁻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, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

- 25 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.

- 30 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.

- 35 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, 0,1 a 1 o de 0,2 a 0,5 wm.

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

En caso adecuado, puede aplicarse una ligera sobrepresión de 10 a 150 kPa.

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

- 45 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 puede controlarse mediante la adición de bases adecuadas, tales como, por ejemplo, NH₄OH, NH₄HCO₃, (NH₄)₂CO₃, NaOH, Na₂CO₃, NaHCO₃, KOH, K₂CO₃, KHCO₃, Mg(OH)₂, MgCO₃, Mg(HCO₃)₂, Ca(OH)₂, CaCO₃, Ca(HCO₃)₂, CaO, CH₃N₂O₂, C₂H₇N, u otras bases y mezclas de las mismas. La condición física de la base puede ser una solución acuosa, suspensión acuosa, gaseosa o sólida.

- 50 Las condiciones particularmente preferidas para producir AS son:

Fuente de carbono: Glucosa, xilosa o maltosa y/o glicerol (incluyendo glicerol en bruto) Temperatura: 30 a 45 °C pH: 6,0 a 7,0, controlado por una base como se ha descrito anteriormente, preferentemente por una fuente de HCO₃⁻ tal como Na₂CO₃, NaHCO₃, Mg(HCO₃)₂, Ca(HCO₃)₂ o Mg(OH)₂, MgCO₃, Ca(OH)₂, CaCO₃. Gas

suministrado: CO₂

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

- 5 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;

y dicho procedimiento está caracterizado además 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/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, pueden convertirse 28 g/l de glicerol en hasta aproximadamente 40 o hasta aproximadamente 35 g/l de ácido succínico.

- 10 En otra realización, la presente invención proporciona un procedimiento para la producción fermentativa de ácido succínico o de una sal o derivado del mismo, comprendiendo dicho procedimiento 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;

- 20 y dicho procedimiento está caracterizado adicionalmente por la conversión de una fuente de carbono seleccionada entre sacarosa, maltosa, D-fructosa, D-glucosa, D-xilosa, L-arabinosa, D-galactosa, D-manosa, y/o glicerol a ácido succínico con un rendimiento de productividad específica de al menos 0,6 g gDCW⁻¹ h⁻¹ de ácido succínico o de al menos 0,65 o de al menos 0,7 g gDCW⁻¹ h⁻¹ de ácido succínico, o de al menos 0,75 g gDCW⁻¹ h⁻¹ de ácido succínico, o de al menos 0,77 g gDCW⁻¹ h⁻¹ de ácido succínico.

- 25 En otra realización, la presente invención proporciona un procedimiento para la producción fermentativa de ácido succínico o de una sal o derivado del mismo, comprendiendo dicho procedimiento 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;

- 30 y dicho procedimiento está caracterizado adicionalmente por la conversión de una fuente de carbono seleccionada entre sacarosa, maltosa, D-fructosa, D-glucosa, D-xilosa, L-arabinosa, D-galactosa, D-manosa, y/o glicerol a ácido succínico con un rendimiento espaciotemporal 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.

- 35 En otra realización, la presente invención proporciona un procedimiento para la producción fermentativa de ácido succínico o de una sal o derivado del mismo, comprendiendo dicho procedimiento 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;

- 40 y dicho procedimiento está caracterizado adicionalmente por la conversión de al menos 28 g/l de una fuente de carbono seleccionada entre sacarosa, maltosa, D-fructosa, D-glucosa, D-xilosa, L-arabinosa, D-galactosa, D-manosa, y/o glicerol a ácido succínico con un rendimiento espaciotemporal 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, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

- 45 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;

- 50 y dicho procedimiento está caracterizado adicionalmente por la conversión de una fuente de carbono seleccionada entre sacarosa, maltosa, D-fructosa, D-glucosa, D-xilosa, L-arabinosa, D-galactosa, D-manosa, y/o glicerol a ácido succínico con un rendimiento de productividad específica de al menos 0,6 g gDCW⁻¹ h⁻¹ de ácido succínico o de al menos 0,65 o de al menos 0,7 g gDCW⁻¹ h⁻¹ de ácido succínico, o de al menos 0,75 g gDCW⁻¹ h⁻¹ de ácido succínico, o de al menos 0,77 g gDCW⁻¹ h⁻¹ de ácido succínico y un rendimiento espaciotemporal 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 identificados anteriormente para producir ácido succínico, la fuente de carbono es glicerol o una mezcla de glicerol y al menos una fuente de carbono adicional seleccionada entre 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.

5 El ácido succínico y/o las sales de ácido succínico producidas pueden aislarse de manera convencional mediante procedimientos conocidos en la técnica, tales 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 hidrogenocarbonato de calcio para la neutralización y filtración del precipitado.

10 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 se precipita. La solución resultante puede purificarse adicionalmente mediante cromatografía de intercambio iónico para eliminar los iones residuales no deseados.

15 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, comprendiendo dicho procedimiento 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.

20 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 del ácido libre obtenido a THF y/o BDO y/o GBL o
b2) la esterificación química del ácido succínico libre obtenido y/o sales de amonio del ácido succínico en su correspondiente éster de di-alquilo inferior y la posterior hidrogenación catalítica en THF y/o BDO y/o GBL.

25 Alquilo inferior representa preferentemente una cadena C₁-C₆ lineal o ramificada, preferentemente un resto alquilo C₁-C₄, 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:

30 a) la producción fermentativa de sales de amonio de ácido succínico como se han definido anteriormente, y
b) la conversión química de sales de amonio de ácido succínico en pirrolidonas de una manera conocida en sí, por ejemplo, tal como se describe en el documento WO-A-2006/066839 (incorporándose dicho documento al presente documento por referencia).

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

Más detalles de la hidrogenación directa de AS:

35 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, incorporado al presente documento por referencia.

40 EL AS se hidrogena de una manera conocida en sí usando procedimientos, aparatos y 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 2000 a 35000 kPa, por ejemplo, de 10000 a 25000 kPa. Los catalizadores usables para la reacción de hidrogenación se conocen por los expertos en la materia. Por ejemplo, pueden usarse diversos catalizadores de paladio/renio/carbono. Los disolventes usables para la reacción de hidrogenación se conocen por los expertos en la materia. Por ejemplo, puede usarse un medio disolvente acuoso.

Más detalles acerca de la esterificación de AS seguida de hidrogenación:

Las condiciones experimentales adecuadas para llevar a cabo la esterificación química, seguida de hidrogenación catalítica directa se conocen bien, y por ejemplo, se describen en la Solicitud de Patente Europea 06007118.0, incorporada al presente documento por referencia.

50 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 se opere 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 estacionado en la columna como resultado de la alimentación de etanol que se evapora en el bucle 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 alcohol. 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 comprende alcohol-agua y/o amoniaco, se extraen de la columna de reacción y por tanto forman el 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 reactivos, 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 10 a 600 kPa, en particular presión estándar

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 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 estérica. Los parámetros óptimos del procedimiento pueden establecerse por el experto en la materia para el ester 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 500 a 10000 kPa, por ejemplo, de 1000 a 5000 kPa. La relación molar de reactivo a hidrógeno se ajusta dentro del intervalo de aproximadamente 1:100 a aproximadamente 1:2000, por ejemplo, de 1:800 a 1:1500.

Los catalizadores usables para la reacción de hidrogenación de la invención se conocen por los expertos en la materia. Por ejemplo, pueden usarse 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 butirrolactona)/THF con catalizadores de cobre también se describen en las siguientes tesis: Schlander, Jan., feb. de 2000, Universidad de Karlsruhe, "Gasphasenhydrierung von Maleinsäuredimethylester zu 1,4-Butandiol, gamma-Butyrolacton und Tetrahydrofuran an Kupfer-Katalysatoren".

Más detalles acerca de 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 variables conocidas por los expertos en la materia o explicadas, por ejemplo, en "Chmiel, Hammes y Bailey: Biochemical Engineering", tales como fermentación por lotes, lotes alimentados, lotes alimentados repetidos o continua con y sin reciclado de la biomasa. Dependiendo de la cepa de producción, burbujear con aire, oxígeno, dióxido de carbono, hidrógeno 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 técnica, 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 valioso, 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 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.

5 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 costes.

10 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 trabajado o se ha trabajado, por ejemplo, tal como se describe en el presente documento.

15 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

20 Para el aislamiento, se usó una estrategia en cuatro etapas, que comprende las etapas de muestreo, cultivo de enriquecimiento, aislamiento de los cultivos puros y ensayo de culos cultivos puros respecto de la producción de ácido succínico (AS).

1. Estrategia experimental

1.1. Muestreo

25 Se tomaron muestras de rumen bovino, lodo digerido de una planta de aguas residuales municipal y pulpa, el resto de la producción de vino. Los hábitats se caracterizan por concentraciones relativamente altas de sustancias orgánicas y una atmósfera rica en CO₂ sin oxígeno. A continuación, se proporciona información más detallada acerca de las muestras, su origen y manipulación.

30 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 CO₂ 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.

35 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 gran depósito. Esta zona debería ser anaerobia. Se recogió pulpa de uvas blancas (Müller-Thurgrau) de un depósito de almacenamiento en el que ya estaba en proceso la fermentación alcohólica.

40 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) ₂ SO ₄	1
CaCl ₂ *2H ₂ O	0,2
MgCl ₂ *6H ₂ O	0,2
NaCl	1
K ₂ HPO ₄	3

(continuación)

Compuesto	Concentración [g/l]
L-cisteína (agente reductor)	0,24
MgCO ₃ ^b	15
Lasalocid ^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
Bacto-Agar (solo para medio sólido)	12

^a D-glucosa, D-xilosa o L-arabinosa^b MgCO₃ (Riedel-de Haen, número de producto: 13117 de Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze, Alemania).^c Solución madre en etanol.^d Solución madre en dimetilsulfóxido^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 o de pulpa 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 esterizaron por filtración, los filtrados estériles se añadieron a los ensayos de enriquecimiento respectivos.

5 Se autoclavaron MgCO₃ y agua (0,75 g y 40 ml) en botellas de suero de 100 ml (121 °C, 20 min). El extracto de levadura, la peptona, la fuente de C, el NH₄SO₄ y el K₂HPO₄ se autoclavaron todos por separado. Para los cloruros de Ca, Mg y Na se preparó una solución madre que se autoclavó. Para asegurar que no hubiese oxígeno presente, se usaron los siguientes procedimientos convencionales:

- Los medios de cultivo se gasearon con CO₂ estéril y libre de oxígeno después del autoclavado.
- Se usó una caja anaerobia (Meintrup DWS Laborgeräte GmbH, Lähden-Holte, Alemania) para los experimentos que habían de realizarse en condiciones anaerobias.
- 10 - La incubación de las placas de agar se produjo en frascos anaerobios. Para asegurar 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.

15 Se rellenaron botellas de 100 ml (Zscheile & Klinger, Hamburgo, Alemania) con 50 ml de medio y 2 ml del inóculo respectivo, se cerraron con tapones de goma de butilo (Ochs GmbH, Bovenden/Lengeln, Alemania) y se gasearon con CO₂. Se ajustó una sobrepresión de aproximadamente 80 kPa. Las botellas se incubaron en un incubador agitado (160 rpm, diámetro de agitación: 2,5 cm) a 37 °C.

20 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 diluir del caldo de cultivo usando detección IR. Se extrajeron muestras del caldo con una jeringuilla estéril a través del tapón de goma de butilo, se llevó a cabo la separación 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 H₂SO₄ como fase móvil y estacionaria, 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

25 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 respecto de la producción de ácido succínico

30 Se ensayaron los cultivos puros en cultivo líquido respecto de 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 a aquellas 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	lasalocid, monensina	lasalocid, monensina	anfotericina B
Tiempo de incubación	< 16 h	< 24 h	< 50 h
^a no se usaron glucosa y xilosa en los ensayos con lodo digerido.			

Para el enriquecimiento de productores de AS del contenido del rumen, la mejor fuente de C es 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 lasalocid 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 con tampón de MgCO₃ 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 está causado por i) la mayor capacidad tamponadora del MgCO₃ ii) su menor estrés osmótico debido a una menor solubilidad y iii) por la liberación de CO₂ a partir del ión carbonato, que es necesario para la biosíntesis del AS.

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

exp. n.º	tiempo de inc. [h]	Fuente de C	Tampón	antibióticos	Agente red.	Fuente de C [g/l]	succínico [g/l]	láctico [g/l]	formico [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 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, presumiblemente por bacterias productoras de ácido propiónico:

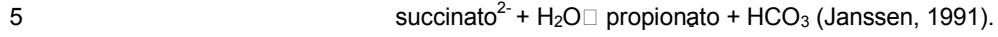


Tabla 4: Resultados de los cultivos de enriquecimiento para productores de AS de lodo digerido.

exp. n.º	tiempo de inc. [h]	Fuente de C	Tampón	antibióticos	Agente red.	Fuente de C [g/l]	succínico [g/l]	lácico [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

- 5 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 fue exitoso si 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 unívocamente 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 de pulpa.

exp. n.º	tipo de uva ^a	tiempo de incubación	Fuente de C	Tampón	antibióticos	Agente red.	Fuente de C total	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	MgCO ₃	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 (Müller-Thurgau) como inóculo.

2.2. Mejores resultados de los experimentos de enriquecimiento

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

Tabla 6: Mejores resultados en cultivos de enriquecimiento respecto de 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 espaciotemporal 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 espaciotemporales 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. Se lograron la mayor concentración de AS (8,8 g/l) y rendimiento espaciotemporal (0,6 g/[l*h]) 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 espaciotemporal y rendimiento de ácido succínico.

3. Conclusión

El procedimiento establecido es adecuado para el enriquecimiento de productores de AS 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 celular de DD1

1. Preparación del medio

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 celulares de DD1.

Compuesto	Concentración [g/l]	Concentración de la solución madre [g/l]
Glucosa	variante ^a	650
Extracto de levadura Bacto (Becton Dickinson)	5	-
Peptona Bacto (Becton Dickinson)	5	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	1	500
CaCl ₂ *2H ₂ O	0,2	20
MgCl ₂ *6H ₂ O	0,2	20
NaCl	1	100
K ₂ HPO ₄	3	500
MgCO ₃	variante ^b	-
Bacto-Agar (solo para medio sólido)	12	-

^a Las concentraciones de glucosa fueron 15 g/l (en las placas) y de 20 o 50 g/l (en medio líquido).

^b MgCO₃ (Riedel-de Haen, número de producto: 13117 de Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH) las concentraciones fueron de 5 g/l (en las placas) y de 0 o 30 g/l (en medio líquido).

5 g de extracto de levadura, 5 g de peptona, MgCO₃ y (para los medios sólidos) 12 g de Bacto-Agar se mezclaron en 900 ml de agua destilada y se autoclavaron (20 min). Después de enfriar hasta aproximadamente 65 °C se añadieron los componentes faltantes como soluciones madre estériles. La glucosa, el sulfato de amonio y el K₂HPO₄ se autoclavaron todos por separado. Los cloruros de Ca, Mg y Na se autoclavaron 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 MgCO₃ con 20 g/l de glucosa para ajustar la DO_{600nm} ≈ 1,0. La inoculación se llevó a cabo con 0,5 ml de esta suspensión celular. Los cultivos se llevaron a cabo en botes de suero de 100 ml con tapones de goma de butilo estancos al aire (Ochs GmbH, Bovenden/Lengler, Alemania) que contenían 50 ml del medio líquido con 20 g/l de glucosa y 30 g/l de MgCO₃ y una atmósfera de CO₂ con una sobrepresión de 80 kPa. Los botes 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 bote y se llevaron a cabo el muestreo y el análisis 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 un bucle del último vial de criogenización sobre placas de agar para el control de contaminación y comprobación en cultivo líquido (medio tal como se describe en la tabla 8) el espectro del producto y la contaminación (mediante microscopía). Las condiciones de HPLC fueron las mismas que aquellas descritas en el ejemplo 1.

3. Preparación de WCB

Se usó un vial del MCB para inocular un bote de suero de 100 ml con un tapón de goma de butilo estanco al aire (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 pureza fueron las mismas que para el MCB. Las condiciones de HPLC fueron las mismas que aquellas 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 ADN_r 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 ADN_r 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 ADN 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 las instrucciones en el protocolo del fabricante. Se usó el sistema de análisis genético CEQ™8000 para la electroforesis de los productos de reacción de secuencia. Se usó el editor ae2 (Maidak y col., 1999) para alinear la secuencia de ADN_r 16S de la cepa DD1 contra aquellas de aproximados representativos de la subclase y de las

Proteobacteria disponibles a través de las bases de datos del EMBL y el 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 de 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 de ADNr 16S de DD1. La figura 3 muestra la secuencia de ADNr 23S de la cepa DD1 y en el anexo 1 se muestra un alineamiento con el ADNr 23S de "*Mannheimia succiniciproducens*" MBEL 55E (número de referencia de la secuencia del genoma completo AE016827).

Ejemplo 4: Morfología celular y morfología de colonias de DD1

Se usó un vial del WCB (ejemplo 2) para inocular un bote de suero de 100 ml con un tapón de goma de butilo estanco al aire (véase más arriba) que contenía 50 ml del medio líquido con 50 g/l de glucosa (composición y preparación como la descrita en el ejemplo 2). La incubación se llevó a cabo durante 15 h a 37 °C y a 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 colonias de DD1, se sembró 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 encuentran individuales, 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 de un diámetro de 0,5-1 mm (crecimiento aerobio) y de 1-2 mm (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) ₂ SO ₄	2	500
CaCl ₂ *2H ₂ O	0,2	20
MgCl ₂ *6H ₂ O	0,2	20
NaCl	2	100
K ₂ HPO ₄	3	500
MgCO ₃ (Riedel-de Haen 13117)	10	-

El extracto de levadura, la polipeptona y el MgCO₃ se autoclavaron juntos. Después de enfriar se añadieron los componentes faltantes como soluciones madre estériles. La glucosa y las otras fuentes de C, el sulfato de amonio y el K₂HPO₄ se autoclavaron todos por separado. Los cloruros de Ca, Mg y Na se autoclavaron juntos. Se añadió Na₂S*9H₂O a una concentración final de 1 mg/l para asegurar las condiciones anaerobias.

2. Cultivos y analíticas

Para cultivar el cultivo de siembra, se usó un vial del WCB para inocular una botella de 100 ml de suero con tapón de goma de butilo hermético a 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 CO₂ con una sobrepresión de 80 kPa. La incubación se llevó a cabo durante 13 h a 37 °C y a 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 MgCO₃ para generar un inóculo sin glucosa (todas las etapas a temperatura ambiente y en la cámara anaerobia).

Los cultivos principales se cultivaron en botellas 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 CO₂ con una sobrepresión de 80 kPa. Para la prueba de utilización de glicerol, se usó la calidad "Glicerol 99 % de pureza" (Riedel-de Haen, número de producto: 15523-1 L-R de Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze, Alemania). La inoculación se llevó a cabo con 1,5 ml del inóculo sin glucosa. Las botellas 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 tabla 10 a continuación.

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

^a Análisis del consumo de cada fuente de C después de 24 h. Los cultivos se llevaron a cabo en duplicados.

^b datos procedentes de los 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 de 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 en la lignocelulosa (Kamm y col., 2006; Lee, 1997). La utilización de L-arabinosa, D-galactosa y D-manosa por MBEL55E no fue probada por Lee y col., 2002a.

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

La productividad de ácido succínico (AS) por DD1 a partir de glicerol, D-xilosa, L-arabinosa, D-galactosa y D-manosa se evaluó en ensayos en botellas 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 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 MgCO₃ 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 crecimiento de los cultivos principales con 10 g/l de glicerol, sacarosa, D-xilosa, D-fructosa, L-arabinosa, D-galactosa, D-manosa o D-glucosa y 10 g/l de MgCO_3 se llevó a cabo del modo 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.

5 3. Resultados

En la tabla 11 a continuación se resumen los resultados.

Tabla 11: Formación de AS y subproducto 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
Δ_{CCS} [g/L] ^b	-5,3	-9,8	-9,3	-9,4	-7,6	-7,8	-7,1	-8,1
Δ_{CSA} [g/L] ^c	+6,4	+5,8	+5,7	+4,8	+4,6	+4,9	+4,5	+4,9
Δ_{CLA} [g/l] ^c	0	+0,1	0	+0,4	0	0	0	0
Δ_{CFA} [g/l] ^c	+0,4	+2,0	+1,8	+2,3	+1,9	+1,6	+1,2	+1,8
Δ_{CAA} [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 la fuente de carbono.

^c formación de ácido succínico, láctico, fórmico y acético.

^d rendimiento espaciotemporal 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 evidentes: i) un rendimiento sustancialmente mayor, ii) una formación de ácido fórmico y acético sustancialmente menor. Por otra parte, la productividad de AS (rendimiento espaciotemporal) con glicerol es ligeramente menor que con los azúcares. Sin embargo, la producción de AS de DD1 con glicerol es sustancialmente mayor que el valor obtenido con *Anaerobiospirillum succiniciproducens* de 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 para ácido succínico, sales de ácido succínico y BDO/GBL/THF o 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.

20 Ejemplo 7: Formación de AS y subproducto 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 botella 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 tabla 12 a continuación.

- 25 Tabla 12: Composición del medio para las pruebas de la formación de AS a partir de diferentes gliceroles en bruto.

Compuesto	Concentración [g/l]	Concentración de la solución madre [g/l]
Fuente de C	variante ^a	variante
Extracto de levadura Bacto (Becton Dickinson)	5	100
Peptona Bacto (Becton Dickinson)	5	100
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1	500
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,2	20
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,2	20
NaCl	1	100
K_2HPO_4	3	500

(continuación)

Compuesto	Concentración [g/l]	Concentración de la solución madre [g/l]
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 MgCO₃ y agua (1,5 g y 40 ml) en botellas de suero de 100 ml (121 °C, 20 min). Después de enfriar, se añadieron soluciones estériles separadas de los otros compuestos. El extracto de levadura, la peptona, el sulfato de amonio y el K₂HPO₄ 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 gliceroleros 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: 15523-1 L-R) de Honeywell Specialty Chemicals Seelze GmbH, Seelze, Alemania.

2. Cultivos y analíticas

El cultivo de siembra se cultivó en una botella de suero de 100 ml con tapón de goma de butilo hermético a 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 CO₂ con una sobrepresión de 80 kPa. 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 a 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 MgCO₃ para generar un inóculo sin glucosa.

Los cultivos principales se cultivaron en botellas 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 CO₂ con una sobrepresión de 80 kPa. La inoculación se llevó a cabo con 2,0 ml del inóculo sin glucosa. Las botellas 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 tabla 13 a continuación se resumen los resultados.

Tabla 13: Formación de AS y subproducto a partir de diferentes gliceroleros por DD1.

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

^a ecoMotion GmbH, Stenberg, Alemania; Biopetrol Schwarzheide GmbH, Schwarzheide, Alemania; Glacon Chemie, Merseburg, Alemania; Riedel de Haen (número de producto: 15523-1 L-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 espaciotemporal 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 gliceroleros C1 a C3 en bruto (7,4 a 8,4 g AS/l y 0,8 a 0,9 AS/[l*h]) es en todos los casos mayor que los valores respectivos obtenidos con el glicerol puro P1 (6,2 g AS/L y 0,7 g AS/[l*h]). Los gliceroleros en bruto tienen, por lo tanto, además de un menor precio, la ventaja de una mejor productividad. Los rendimientos obtenidos con los gliceroleros 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 amoníaco y la glucosa

- 5 Una estrategia 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 por NH_3 con un determinado nivel inicial de glucosa. Esta configuración necesita que la cepa sea tolerante tanto a $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{OH}^-$ como a la glucosa. Para probar a DD1 respecto de 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

- 10 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	Variante ^a	650
Extracto de levadura Bacto (Becton Dickinson)	5	-
Peptona Bacto (Becton Dickinson)	5	-
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1	500
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,2	20
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,2	20
NaCl	1	100
K_2HPO_4	3	500
L-cisteína	0,24	120
MgCO_3 (Riedel-de Haen 13117)	2	-

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

- 15 El extracto de levadura, la peptona y el MgCO_3 se autoclavaron juntos en los fermentadores y las botellas de suero. La glucosa, el sulfato de amonio y el K_2HPO_4 se autoclavaron todos por separado. Los cloruros de Ca, Mg y Na se autoclavaron juntos. Después de enfriar los fermentadores y las botellas de suero, se añadieron los componentes faltantes 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

- 20 Los precultivos se cultivaron en condiciones anaerobias en botes de suero de 100 ml con tapones de goma de butilo estancos al aire (Ochs GmbH, Bovenden/Lengler, Alemania) que contenían 50 ml de medio de precultivo a 37 °C en un incubador agitado (velocidad de rotación: 160 rpm, diámetro de agitación: 2,5 cm). La inoculación de los precultivos se llevó a cabo con 1 ml de un banco celular de trabajo de 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 80 kPa. Después de 16 a 18 h de incubación, se reunieron dos botellas 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 se había gaseado durante toda la noche con CO_2 para asegurar condiciones sin oxígeno. La temperatura de cultivo fue de 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

Los resultados se muestran en la figura 5.

- 35 En los cultivos por lotes controlados por 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 a 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 no 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 por NH_4OH con 75 g/l de glucosa.

1. Preparación del medio

- 5 Aparte de la concentración constante de glucosa, la composición y preparación del medio fueron iguales a aquellas en el ejemplo 8, "Tolerancia de DD1 al amoníaco y la glucosa".

2. Cultivos y analíticas

- 10 Aparte de los diferentes valores de temperatura y pH de cultivo ensayados, las condiciones experimentales de los cultivos y los análisis HPLC fueron idénticas a aquellas en el ejemplo 8 "Tolerancia de DD1 al amoníaco y la glucosa".

3. Resultados

- 15 Los resultados se muestran en la figura 6. La figura 6 muestra que los dos ensayos a 37 °C y pH 6,5 son muy similares respecto tanto del consumo de glucosa como de la producción de AS, lo que indica una baja 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 proceso. Sin embargo, los ensayos a 37 °C indican que una reducción del pH en 0,5 unidades da como resultado una evidente disminución de la productividad de AS y un aumento de pH de 0,5 unidades da como resultado una ligera reducción. Basándose en estos resultados, los cultivos posteriores de DD1, en caso de ser posible el control del pH, se llevó a cabo a pH 6,5.

Ejemplo 10: Efecto de los ingredientes del medio complejo en el cultivo de DD1

- 20 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
25 composición inicial del medio 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

- 30 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 aquellas en el ejemplo 8 "Tolerancia de DD1 al amoníaco y la glucosa". La concentración por lotes de glucosa fue de 50 g/l en todos los ensayos.

2. Cultivos y analíticas

- 35 Las condiciones experimentales fueron idénticas a aquellas en el ejemplo 8 "Tolerancia de DD1 al amoníaco 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 HPLC se llevaron a cabo como se ha descrito en el ejemplo 8.

3. Resultados

- 40 Los resultados se muestran 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.

- 45 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

- 50 Ya que la producción fermentativa de AS es un proceso 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

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

2. Cultivos y analíticas

10 Los cultivos de siembra anaerobios se cultivaron en botellas de suero de 100 ml con tapones de goma herméticos a 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 CO_2 con una sobrepresión de 80 kPa a 37 °C y 160 rpm (diámetro de agitación: 2,5 cm) durante 16 h. La inoculación se llevó a cabo con 1 ml del WCB (ejemplo 2). Se usaron 7,5 ml de estos precultivos para inocular los cultivos aerobios principales.

15 Los cultivos aerobios principales (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

20 Los resultados se muestran en la figura 9. Los resultados muestran claramente 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 15 h de cultivo. Los datos demuestran claramente que DD1 es tolerante al oxígeno.

Ejemplo 12: Puesta de DD1 en condiciones descritas por KAIST

25 El familiar más próximo de DD1 es "*Mannheimia succiniciproducens*" MBEL 55E, una cepa aislada por KAIST (véase más arriba). Para comparar a 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 idéntico 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	-
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1	500
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,2	20
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,2	20
NaCl	1	100
K_2HPO_4	3	500
MgCO_3 (Riedel-de Haen 13117)	10	-

30 El extracto de levadura, la peptona y el MgCO_3 se autoclavaron juntos en los fermentadores y las botellas de suero. Se autoclavaron por separado la glucosa, el sulfato de amonio y el fosfato de potasio. Los cloruros de Ca, Mg y Na se autoclavaron juntos. Después de enfriar los fermentadores y las botellas de suero, se añadieron los componentes faltantes como soluciones madre estériles. Para los cultivos de siembra se usó el mismo medio.

2. Cultivos y analíticas

40 El cultivo de siembra se cultivó de manera anaerobia en un bote de suero de 100 ml con tapones de goma de butilo estancos al gas 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 llevó a cabo 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 80 kPa. 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 contenían 300 ml de medio de cultivo que se había gaseado durante toda la noche con

CO₂ para asegurar 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 CO₂ gaseoso se ajustó a 0,25 w. La velocidad del agitador se ajustó a 500 rpm. Se midieron el consumo de glucosa y la formación de AS y subproducto mediante HPLC, como se ha descrito en el ejemplo 1.

3. Resultados

- 5 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 de producto que es similar al de MBEL55E. Sin embargo, el rendimiento espaciotemporal obtenido con DD1 para ácido succínico es de 2,5 g/(l*h), que es claramente mayor al obtenido con 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.

10 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 aguas abajo y diseñar un medio sintético adelgazado para una fermentación económica. Por lo tanto, se diseñó un medio sintético para DD1. Mientras tanto, también se había publicado un medio sintético para el familiar cercano, *Mannheimia succiniciproducens* (Song y col., 2008). Se habían determinado compuestos
15 esenciales y estimuladores para el crecimiento de DD1. Comparando los resultados con *Mannheimia succiniciproducens* se observaron diferencias evidentes, que daban indicaciones para 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 sintéticos para bacterias del rumen (Nili y Brooker, 1995, McKinlay y col., 2005), a 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 (NH₄)₂SO₄, 0,2 g/l de CaCl₂*2H₂O, 0,2 g/l de MgCl₂*6H₂O, 1 g/l de NaCl, 3 g/l de K₂HPO₄, 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.

- Se autoclavaron las botellas de suero que contenían 50 ml de medio complejo o sintético con agua y 30g/l de MgCO₃ como sistema de tampón. Se esterilizaron, por separado, la glucosa, el sulfato de amonio y el fosfato de potasio. 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 las botellas 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 MgCO₃. 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 medio complejo de manera anaerobia usando un bote de suero de 100 ml con tapones de goma de butilo estancos al gas 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 CO₂ puro con una sobrepresión de aproximadamente 80 kPa. 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 (NH₄)₂SO₄, 0,4 g/l de CaCl₂*2H₂O, 0,4 g/l de MgCl₂*6H₂O, 2 g/l de NaCl y 6 g/l de K₂HPO₄ antes de su inoculación en el segundo cultivo de siembra en una botella de suero 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 para 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 que en el 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 adelgazado 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 cultivo	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 del 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 a DD1 del modo siguiente. Se sembraron células de una solución madre congelada en una placa de BHI-agar (Becton Dickinson). Se desprendieron las células y se suspendieron en medio BHI y se incubaron en una botella de suero anaerobia a 37 °C durante 5,5 h. Se inocularon las células en el medio que contenía los compuestos descritos en la tabla 17 usando botellas de suero de 100 ml. La DO inicial a 600 nm fue de 0,1 (determinada en un recorrido de 1 ml). Los componentes 1-7 del medio se autoclavaron juntos, el compuesto 8 se autoclavó en la botella de suero, los compuestos 9 y 10 se autoclavaron por separado y se añadieron al medio final. Se burbujearon las botellas de suero al menos tres veces con CO₂ a través de los tapones de goma de butilo y se dejó una sobrepresión de CO₂ de 80 kPa. Las botellas de suero se incubaron a 200 rpm y 37 °C. Después de 24 h, se abrieron las botellas 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) ₂ SO ₄	2
4	CaCl ₂ *2H ₂ O	0,2
5	MgCl ₂ *6H ₂ O	0,2
6	NaCl	2
7	K ₂ HPO ₄	3
8	MgCO ₃ (Riedel-de Haen 13117)	50
9	NaHCO ₃	25
10	Glicerol	70

Tabla 18: Resultados del ejemplo 14

Metabolización de glicerol	
t _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
ΔC _{AA} [g/l] ^e	+2,5
STY [g/(l*h)] ^f	1,47
Rendimiento [g/g] ^f	1,24
Proporción AS/AF ^g	14,7
Proporción AS/AA	14,1

(continuación)

Metabolización de glicerol^c tiempo de cultivo.^d consumo de glicerol.^e formación de ácido succínico, láctico, fórmico y acético.^f rendimiento espaciotemporal y rendimiento de ácido succínico.^g relación en g/l de ácido succínico por g de producto secundario de ácido fórmico (AF) y ácido acético (AA)**2. Resultados:**

- 5 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 espaciotemporal 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 1 M de glicerol y 1 M de CO₂ a 1 M de ácido succínico (Song y Lee, 2006).

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

- 10 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

- 15 Se sembraron células de una solución madre congelada en una placa de BHI-agar (Becton Dickinson). Se desprendieron las células y se suspendieron en medio BHI y se incubaron en una botella de suero anaerobia a 37 °C durante 5,5 h. El medio se describe en la tabla 19. Se usaron botellas 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 las botellas de suero al menos tres veces con CO₂ a través de los tapones de goma de butilo y se dejó una sobrepresión de CO₂ de 80 kPa. Las botellas 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 ₂ O	22
Glicerol	56,82
Extracto de levadura Bacto	10
(NH ₄) ₂ SO ₄	2
CaCl ₂ *2H ₂ O	0,2
MgCl ₂ *6H ₂ O	0,2
NaCl	2
K ₂ HPO ₄	3
NaHCO ₃	8,4
MgCO ₃	50
Propilenglicol 1200 antiespumante	0,1

- 20 El cultivo de siembra se inoculó con 2 ml de un cultivo congelado cultivado en condiciones anaerobias en una botella de suero de 200 ml con tapones de goma de butilo herméticos a 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). La botella se burbujó con CO₂ puro con una sobrepresión de aproximadamente 80 kPa. 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 gasó con CO₂ para asegurar condiciones sin oxígeno. La temperatura de cultivo se mantuvo a 37 °C y el pH a 6,5 sin adición de bases, salvo el tampón de MgCO₃ en el medio. La corriente de CO₂ gaseoso se ajustó a 0,2 w/m. La velocidad del agitador se ajustó a 300 rpm. Se midieron el consumo de maltosa y glicerol y la formación de AS y subproducto mediante HPLC, como se ha descrito en el ejemplo 1. Las células se cultivaron a 37 °C y se determinó la biomasa y disolviendo el MgCO₃ residual mediante la adición de HCl 1M. Después de disolver el MgCO₃, las células se lavaron con agua y se secaron mediante liofilización. La biomasa seca se determinó mediante pesada.

Resultados:

Los resultados se resumen en la tabla 20. A las 16 h de incubación, 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 espaciotemporal obtenido con DD1 para ácido succínico es de 3,4 g/(l*h), que es claramente mayor que el comunicado 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 y 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 y Lee, 2006).

El rendimiento espaciotemporal 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 de ácido succínico de $0,77 \text{ [g gDCW}^{-1} \text{ h}^{-1}]^h$ 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
$\Delta C_{\text{glicerol}}$ [g/l] ^d	-36,5
$\Delta C_{\text{ácido succínico}}$ [g/l] ^e	57,54
$\Delta C_{\text{maltosa}}$ [g/l] ^d	-11,2
ΔC_{AF} [g/l] ^e	3,7
ΔC_{AA} [g/l] ^e	3,41
STY [g/(l*h)] ^f	3,4
Rendimiento de succinato [g/g] ^g	1,2
Productividad específica para AS [g gDCW ⁻¹ h ⁻¹] ^h	0,77
^b tiempo de cultivo	
^c biomasa seca determinada mediante solubilización de MgCO ₃ .	
^d consumo de glicerol o maltosa	
^e formación de ácido succínico, fórmico y acético.	
^f rendimiento espaciotemporal 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	

Sumario de los experimentos

1. La cepa DD1 de la presente invención tiene características muy prometedoras:

- Parámetros de productividad atractivos para glicerol (título de AS: hasta 57 g/l, rendimiento espaciotemporal de 3,4 g/(l*h) de ácido succínico, una productividad específica para 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 de manera eficaz en AS, lo que indica su adecuación 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, rendimientos espaciotemporales y las productividades específicas y las proporciones de producto/subproducto son sustancialmente mayores y mejores que con D-glucosa y otros azúcares.
- Se tolera NH₃/NH₄OH para el control del 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 de manera eficaz en AS, lo que indica su adecuación 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 separadas se convierte de manera eficaz en ácido succínico.
- Es posible el crecimiento celular aerobio, 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.

5 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 succinate-fermenting anaerobic bacterium isolated from a glycolate-degrading mixed culture. *Arch Microbiol* 155: 288-293.
- 10 Jukes TH, Cantor CR (1969) Evolution of protein molecules. En: *Mammalian Protein Metabolism*, vol 3, págs. 21-132. Editado por Munro HN. Nueva York: Academic Press
- Kamm B, Kamm M, Schmidt M, Hirth T, Schulze M (2006) Lignocellulose-based chemical products and product family trees. En: Kamm B, Gruber, PR, Kamm M (eds.) *Biorefineries - Industrial Processes and products. Status Quo and future directions*. vol. 2. Wiley-VCH, Weinheim.
- 15 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.
- 20 Lee PC, Lee WG, Lee SY, Chang HN (2001) Succinic acid production with reduced byproduct formation in the fermentation of *Anaerobiospirillum succiniciproducens* using glycerol as a carbon source. *Biotech Bioeng* 72: 41-48.
- Lee SY, Chang HN, Lee PC, Lee WG (2002b) Organic acid producing microorganism and process for preparing organic acids employing the same. Documento WO 02/00846 A2,
- 25 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.
- 30 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 distinct actinomycete lineage: proposal of *Nocardiopsaceae* fam. nov. *Int J Syst Bacteriol* 46: 1088-1092.
- 35 Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4: 406-425.
- Song H y 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.
- 40 Yazdani S, Gonzalez R (2007) Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. *Curr Opin Biotechnol* 18: 213-219.

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

LISTADO DE SECUENCIAS

- 45 <110> BASF SE
- <120> Ácido succínico producido

<130> M/47282

<160> 2

5 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 1517

<212> ADN

10 <213> *Pasteurella* sp.

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1517)

15 <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 cggtcacgac tctacggga ggcagcagtg gggaatattg      360
cacaatgggg ggaaccctga tgcagccatg ccgctgaat gaagaaggcc ttcgggttgt      420
aaagttcttt cggtgacgag gaaggtgttt gttttaatag gacaagcaat tgacgttaat      480
cacagaagaa gcaccggcta actccgtgcc agcagccgcg gtaatacggg ggggtgcgagc      540
gttaatcgga ataactgggc gtaaagggca tgcaggcgga cttttaagtg agatgtgaaa      600
gccccgggct taacctggga attgcatttc agactgggag tctagagtac tttagggagg      660
ggtagaattc cacgtgtagc ggtgaaatgc gtagagatgt ggaggaatac cgaaggcgaa      720
ggcagccctt tgggaagata ctgacgctca tatgcgaaag cgtgggggagc aaacaggatt      780
agataccctg gtagtcacg cggtaaacgc tgtcgatttg gggattgggc tttaggcctg      840
gtgctcgtag ctaacgtgat aaatcgaccg cctggggagt acggccgcaa gggtaaaact      900
caaatgaatt gacggggggc cgcacaagcg gtggagcatg tggtttaatt cgatgcaacg      960
cgaagaacct tacctactct tgacatccag agaatcctgt agagatacgg gagtgccttc     1020
gggagctctg agacaggtgc tgcattggctg tcgtcagctc gtgttgtgaa atgttggggt     1080

```

aagtcgccgca acgagcgcaa cccttatcct ttgttgccag catgtaaaga tgggaactca 1140
aaggagactg ccggtgacaa accggaggaa ggtggggatg acgtcaagtc atcatggccc 1200
ttacgagtag ggctacacac gtgctacaat ggtgcataca gagggcggcg ataccgcgag 1260
gtagagcgaa tctcagaaag tgcacgtag 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 acttgagggt gtatgggttaa gtgactaagc 60
gtacaagggtg gatgccttgg caatcagagg cgaagaagga cgtgctaata tcgaaaaagc 120
ttgggtgagt tgataagaag cgtctaacc aagatatccg aatggggcaa cccagtagat 180
gaagaatcta ctatcaataa ccgaatccat aggttattga ggcaaaccgg gagaactgaa 240
acatctaagt accccgagga aaagaaatca accgagatta cgtcagtagc ggcgagcgaa 300
agcgtaagag ccggcaagtg atagcatgag gattagagga atcggtggg aagccggggc 360
gcacaggggtg atagccccgt acttgaaaat cattgtgtgg tactgagctt gcgagaagta 420
gggcggggaca cgagaaatcc tgtttgaaga aggggggacc atcctccaag gctaaatact 480
cctgattgac cgatagttaa ccagtactgt gaaggaaagg cgaaaagaac cccggtgagg 540
ggagtgaat agaacctgaa accttgtagc tacaagcagt gggagccgc gaggtgact 600
gcgtaccttt tgtataatgg gtcagcgact tatattatgt agcgagggtta accgaatagg 660
ggagccgaag ggaaaccgag tcttaactgg gcgtcgagtt gcatgatata gaccgaaac 720
ccggtgatct agccatgggc aggttgaagg ttgggtaaca ctaactggag gaccgaaccg 780
actaatgttg aaaaattagc ggatgacctg tggctggggg tgaaaggcca atcaaaccgg 840
gagatagctg gttctccccg aaatctatct aggtagagcc ttatgtgaat accttcgggg 900

gtagagcact gtttcggcta gggggccatc ccggcttacc aaccgatgc aaactgcgaa 960
 taccgaagag taatgcatag gagacacacg ggggtgcta acgttcgtcg tggagagggg 1020
 aacaaccag accgccagct aaggtcccaa agtttatatt aagtgggaaa cgaagtggga 1080
 aggcttagac agctaggatg ttggcttaga agcagccatc atttaaagaa agcgtaatag 1140
 ctactagtc gagtcggcct gcgcggaaga tgtaacgggg ctcaaata gcaccgaagc 1200
 tgcggcatca ggcgtaagcc tggtgggtag gggagcgtcg tgtaagcgga agaagggtgt 1260
 tcgagagggc tgctggacgt atcacgagt cgaatgctga cataagtaac gataaaacgg 1320
 gtgaaaaacc cgttcgccgg aagaccaagg gttcctgtcc aacgttaatc ggggcagggt 1380
 gagtcggccc ctaaggcgag gctgaagagc gtagtcgatg ggaaacgggt taatattccc 1440
 gtacttgta taattgcgat gtggggacgg agtaggttag gttatcgacc tgttgaaaa 1500
 ggtcgttta gttggtagggt ggagcgttta ggcaaaccg gacgcttacc aacaccgaga 1560
 gatgatgac aggcgctaag gtgccgaagt aaccgatacc acacttcag gaaaagccac 1620
 taagcgtcag attataataa accgtactat aaaccgacac aggtgggtcag gtagagaata 1680
 ctcaggcgct tgagagaact cgggtgaagg aactaggcaa aatagcaccg taacttcggg 1740
 agaagggtcg ccggcgtaga ttgtagagggt atacccttga aggttgaacc ggtcgaagt 1800
 acccgctggc tgcaactgtt tattaaaaac acagcactct gcaaacacga aagtggacgt 1860
 ataggggtg atgcctgccc ggtgctggaa ggttaattga tggcgttacc gcaagagaag 1920
 cgctgatcg aagccccagt aaacggcggc cgtaactata acggtcctaa ggtagcgaaa 1980
 ttccttgctg ggtaagttcc gacctgcacg aatggcataa tgatggccag gctgtctcca 2040
 cccgagactc agtgaaattg aaatcgccgt gaagatgcgg tgtaccgcg gctagacgga 2100
 aagaccccg 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 gttagtgcga tgggtataagc aagcttaact gcgagacgga 2400
 caagtcgagc aggtgcgaaa gcaggtcata gtgatccgggt gggtctgaat ggaagggcca 2460
 tcgctcaacg gataaaagggt actccgggga taacaggctg ataccgcca agagtccata 2520
 tcgacggcgg tgtttggcac ctcgatgtcg gctcatcaca tcctggggct gaagtaggtc 2580
 ccaaggggat ggctgttcgc catttaaagt ggtacgcgag ctgggtttaa aacgtcgtga 2640

gacagtttgg tccctatctg ccgtgggCGT tggagaattg agaggggctg ctccctagtag	2700
gagaggaccg gAgTggacgc atcaCtggTg ttccggTtgt gtccgCagac 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 tggtagtgaag agttattacg gaataagtaa gtagtcaggg	3000
aatcggt	3008

REIVINDICACIONES

1. Una cepa bacteriana DD1 depositada en el DSMZ que tiene el número de depósito DSM 18541.
2. Un procedimiento de producción fermentativa de un ácido orgánico o una sal o derivado del mismo, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:
 - 5 a) incubar una cepa bacteriana como se ha descrito en la reivindicación 1 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.
3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que la fermentación se lleva a cabo a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 10 a aproximadamente 60 °C a un pH de 5,0 a 9,0 en presencia de dióxido de carbono.
4. El procedimiento de la reivindicación 2 o 3, en el que dicho ácido orgánico es ácido succínico.
5. El procedimiento de las reivindicaciones 2 a 4, en el que la fuente de carbono asimilable se selecciona entre glicerol, sacarosa, maltosa, D-fructosa, D-galactosa D-manosa, D-glucosa, D-xilosa, L-arabinosa, productos de descomposición del almidón, celulosa, hemicelulosa y lognocelulosa; y mezclas de los mismos.
- 15 6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que la fuente de carbono es glicerol o una mezcla de glicerol y al menos una fuente de carbono adicional seleccionada entre sacarosa, maltosa, D-fructosa, D-galactosa D-manosa, D-glucosa, D-xilosa, y L-arabinosa.
7. El procedimiento de las reivindicaciones 2 a 6, en el que la concentración de la fuente de carbono asimilable se ajusta a un valor en el intervalo de 5 a 80 g/l.
- 20 8. Un procedimiento de producción fermentativa de ácido succínico o una sal o derivado del mismo, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:
 - a) incubar una cepa bacteriana como se ha descrito en la reivindicación 1 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;
 - 25 b) obtener dicho ácido orgánico o sal o derivado del mismo del medio; además **caracterizado por** al menos una de las siguientes características:
 - c) 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;
 - d) conversión de 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 a ácido succínico con un rendimiento de productividad específica de al menos 0,6 g gDCW⁻¹ h⁻¹ de ácido succínico;
 - 30 e) conversión de 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 a ácido succínico con un rendimiento espaciotemporal de al menos 2,2 g/(l*h) de ácido succínico;
 - 35 f) conversión de al menos 28 g/l de 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 a ácido succínico con un rendimiento espaciotemporal de al menos 2,2 g/(l*h);
 - g) conversión de 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 a ácido succínico con un rendimiento de productividad específica de al menos 0,6 g gDCW⁻¹ h⁻¹ de ácido succínico y un rendimiento espaciotemporal para el ácido succínico de al menos 2,2 g/(l*h).
9. El procedimiento de las reivindicaciones 2 a 8, que se lleva a cabo de manera discontinua o continua.
10. Un procedimiento de producción de ácido succínico y/o sales de amonio de ácido succínico, comprendiendo dicho procedimiento la producción fermentativa de ácido succínico de acuerdo con las reivindicaciones 2 a 9 y controlar el pH con amoníaco o una solución acuosa del mismo, o NH₄HCO₃, (NH₄)₂CO₃, NaOH, Na₂CO₃, NaHCO₃, KOH, K₂CO₃, KHCO₃, Mg(OH)₂, MgCO₃, MgH(CO₃)₂, Ca(OH)₂, CaCO₃, Ca(HCO₃)₂, CaO, CH₆N₂O₂, C₂H₇N y mezclas de los mismos.
- 45 11. Un procedimiento de producción de tetrahidrofurano (THF) y/o 1,4-butanodiol (BDO) y/o gamma-butirolactona (GBL), que comprende
 - 50 a) la producción fermentativa de ácido succínico y/o sales de ácido succínico, tal como se define en la reivindicación 10, y
 - b1) bien la hidrogenación catalítica del ácido libre obtenido a THF y/o BDO y/o GBL o
 - b2) la esterificación química de ácido succínico libre obtenido y/o sales de ácido succínico en su correspondiente éster de di-alquilo inferior y la posterior hidrogenación catalítica en THF y/o BDO y/o GBL.

12. Un procedimiento de producción de pirrolidonas que comprende
- a) la producción fermentativa de sales de amonio de ácido succínico como se ha definido en la reivindicación 10, y
 - b) la conversión química de sales de amonio de ácido succínico en pirrolidonas.
- 5 13. Un procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 12, en el que dicho glicerol, que se usa como fuente de carbono asimilable, se obtiene mediante la escisión éster de triacilglicéridos.
14. El procedimiento de la reivindicación 13, en el que el glicerol es un producto de desecho de la producción de biodiésel.
- 10 15. El uso de una cepa bacteriana como se ha definido en la reivindicación 1 para la producción fermentativa de un agente químico orgánico refinado.
16. El uso de la reivindicación 15, en el que el agente químico orgánico refinado es ácido succínico o una sal o derivado del mismo.

ANEXO 1

Alineamiento completo entre ARNr 23S de *M. succiniproducens* MBEL55 (ARNr_23s_[1-61] y DD1 de BASF

ARNr_23s_5	1	-----	100
ARNr_23s_3	(1)	-----	
ARNr_23s_1	(1)	-----	
ARNr_23s_2	(1)	-----	
ARNr_23s_6	(1)	-----	
ARNr_23s_4	(1)	-----	
23s_DDL_seq_rev	(1)	-----	
ARNr_23s_5	101	-----	200
ARNr_23s_3	(1)	-----	
ARNr_23s_1	(1)	-----	
ARNr_23s_2	(1)	-----	
ARNr_23s_6	(1)	-----	
ARNr_23s_4	(1)	-----	
23s_DDL_seq_rev	(1)	-----	
ARNr_23s_5	201	-----	300
ARNr_23s_3	(47)	GAAGAAGGAGTGTCTGCGAAAAGCTTGGGTGAGTTGATAAGAAGCGCTTAACCAAGATATCCGAATGGGGCAACCCAGTAGATGAAGAATCTAC	
ARNr_23s_1	(47)	GAAGAAGGAGTGTCTGCGAAAAGCTTGGGTGAGTTGATAAGAAGCGCTTAACCAAGATATCCGAATGGGGCAACCCAGTAGATGAAGAATCTAC	
ARNr_23s_2	(47)	GAAGAAGGAGTGTCTGCGAAAAGCTTGGGTGAGTTGATAAGAAGCGCTTAACCAAGATATCCGAATGGGGCAACCCAGTAGATGAAGAATCTAC	
ARNr_23s_6	(47)	GAAGAAGGAGTGTCTGCGAAAAGCTTGGGTGAGTTGATAAGAAGCGCTTAACCAAGATATCCGAATGGGGCAACCCAGTAGATGAAGAATCTAC	
ARNr_23s_4	(47)	GAAGAAGGAGTGTCTGCGAAAAGCTTGGGTGAGTTGATAAGAAGCGCTTAACCAAGATATCCGAATGGGGCAACCCAGTAGATGAAGAATCTAC	
23s_DDL_seq_rev	(47)	GAAGAAGGAGTGTCTGCGAAAAGCTTGGGTGAGTTGATAAGAAGCGCTTAACCAAGATATCCGAATGGGGCAACCCAGTAGATGAAGAATCTAC	
ARNr_23s_5	301	-----	400
ARNr_23s_3	(147)	TATCAATAACCGGAATCCATAGGTTATTGAGGCAAAACCGGAGAACTGAAACATCTAAGTACCCCGAGGAGAAAGAAATCAACCGAGATTACGTCAGTAGCG	
ARNr_23s_1	(147)	TATCAATAACCGGAATCCATAGGTTATTGAGGCAAAACCGGAGAACTGAAACATCTAAGTACCCCGAGGAGAAAGAAATCAACCGAGATTACGTCAGTAGCG	
ARNr_23s_2	(147)	TATCAATAACCGGAATCCATAGGTTATTGAGGCAAAACCGGAGAACTGAAACATCTAAGTACCCCGAGGAGAAAGAAATCAACCGAGATTACGTCAGTAGCG	
ARNr_23s_6	(147)	TATCAATAACCGGAATCCATAGGTTATTGAGGCAAAACCGGAGAACTGAAACATCTAAGTACCCCGAGGAGAAAGAAATCAACCGAGATTACGTCAGTAGCG	
ARNr_23s_4	(147)	TATCAATAACCGGAATCCATAGGTTATTGAGGCAAAACCGGAGAACTGAAACATCTAAGTACCCCGAGGAGAAAGAAATCAACCGAGATTACGTCAGTAGCG	
23s_DDL_seq_rev	(147)	TATCAATAACCGGAATCCATAGGTTATTGAGGCAAAACCGGAGAACTGAAACATCTAAGTACCCCGAGGAGAAAGAAATCAACCGAGATTACGTCAGTAGCG	
ARNr_23s_5	401	-----	500
ARNr_23s_3	(247)	GCAGGCGAAAGCGTAAGAGCCGGCAAGTATGATAGAGAAACGGGTGGGAACCGCGCGGCACAGGGTGATAGCCCCCTACTTTGAAATC	
ARNr_23s_1	(247)	GCAGGCGAAAGCGTAAGAGCCGGCAAGTATGATAGAGAAACGGGTGGGAACCGCGCGGCACAGGGTGATAGCCCCCTACTTTGAAATC	
ARNr_23s_2	(247)	GCAGGCGAAAGCGTAAGAGCCGGCAAGTATGATAGAGAAACGGGTGGGAACCGCGCGGCACAGGGTGATAGCCCCCTACTTTGAAATC	
ARNr_23s_6	(247)	GCAGGCGAAAGCGTAAGAGCCGGCAAGTATGATAGAGAAACGGGTGGGAACCGCGCGGCACAGGGTGATAGCCCCCTACTTTGAAATC	
ARNr_23s_4	(247)	GCAGGCGAAAGCGTAAGAGCCGGCAAGTATGATAGAGAAACGGGTGGGAACCGCGCGGCACAGGGTGATAGCCCCCTACTTTGAAATC	
23s_DDL_seq_rev	(247)	GCAGGCGAAAGCGTAAGAGCCGGCAAGTATGATAGAGAAACGGGTGGGAACCGCGCGGCACAGGGTGATAGCCCCCTACTTTGAAATC	
ARNr_23s_5	501	-----	600
ARNr_23s_3	(347)	ATTGTGTGGTACTGAGCTTGGCAGAGTAGGGCGGACACAGAGAAATCTCTTTGAAGAAGGGGGACCATCTCTCAAGGCTAAATCTCTCTGATTGACC	
ARNr_23s_1	(347)	ATTGTGTGGTACTGAGCTTGGCAGAGTAGGGCGGACACAGAGAAATCTCTTTGAAGAAGGGGGACCATCTCTCAAGGCTAAATCTCTCTGATTGACC	
ARNr_23s_2	(347)	ATTGTGTGGTACTGAGCTTGGCAGAGTAGGGCGGACACAGAGAAATCTCTTTGAAGAAGGGGGACCATCTCTCAAGGCTAAATCTCTCTGATTGACC	

ARNr_23s_6	(347)	ATTGTGTGCTACTGAGCTTGCAGAAAGTAGGGGGGACACGAGAAATCTCTGTTGAAGAGGGGGGACCATCTCCAAAGGTAATACCTCTGATTTGACC	700
ARNr_23s_4	(347)	ATTGTGTGCTACTGAGCTTGCAGAAAGTAGGGGGGACACGAGAAATCTCTGTTGAAGAGGGGGGACCATCTCCAAAGGTAATACCTCTGATTTGACC	
23s_DDI_seq_rev	(392)	ATTGTGTGCTACTGAGCTTGCAGAAAGTAGGGGGGACACGAGAAATCTCTGTTGAAGAGGGGGGACCATCTCCAAAGGTAATACCTCTGATTTGACC	
ARNr_23s_5	(447)	GATAGTGAACGACTACTGCTGAAGAAAGGCGAAAGAACCCCGGTGAGGGGAGTGAATAGAACTGAAACCTTGTCGTACAAAGCAGTGGGAGCCCGGG	
ARNr_23s_3	(447)	GATAGTGAACGACTACTGCTGAAGAAAGGCGAAAGAACCCCGGTGAGGGGAGTGAATAGAACTGAAACCTTGTCGTACAAAGCAGTGGGAGCCCGGG	
ARNr_23s_1	(447)	GATAGTGAACGACTACTGCTGAAGAAAGGCGAAAGAACCCCGGTGAGGGGAGTGAATAGAACTGAAACCTTGTCGTACAAAGCAGTGGGAGCCCGGG	
ARNr_23s_2	(447)	GATAGTGAACGACTACTGCTGAAGAAAGGCGAAAGAACCCCGGTGAGGGGAGTGAATAGAACTGAAACCTTGTCGTACAAAGCAGTGGGAGCCCGGG	
ARNr_23s_6	(447)	GATAGTGAACGACTACTGCTGAAGAAAGGCGAAAGAACCCCGGTGAGGGGAGTGAATAGAACTGAAACCTTGTCGTACAAAGCAGTGGGAGCCCGGG	
ARNr_23s_4	(447)	GATAGTGAACGACTACTGCTGAAGAAAGGCGAAAGAACCCCGGTGAGGGGAGTGAATAGAACTGAAACCTTGTCGTACAAAGCAGTGGGAGCCCGGG	
23s_DDI_seq_rev	(492)	GATAGTGAACGACTACTGCTGAAGAAAGGCGAAAGAACCCCGGTGAGGGGAGTGAATAGAACTGAAACCTTGTCGTACAAAGCAGTGGGAGCCCGGG	
ARNr_23s_5	(547)	AGGTTGACTGCGTACCTTTTGTATATATGGTTCAGCGACTTATATATATAGCGAGGTTTACCGRATAGGGGAGCCGAGGAAACCCGAGTCTTAACTGGG	800
ARNr_23s_3	(547)	AGGTTGACTGCGTACCTTTTGTATATATGGTTCAGCGACTTATATATATAGCGAGGTTTACCGRATAGGGGAGCCGAGGAAACCCGAGTCTTAACTGGG	
ARNr_23s_1	(547)	AGGTTGACTGCGTACCTTTTGTATATATGGTTCAGCGACTTATATATATAGCGAGGTTTACCGRATAGGGGAGCCGAGGAAACCCGAGTCTTAACTGGG	
ARNr_23s_2	(547)	AGGTTGACTGCGTACCTTTTGTATATATGGTTCAGCGACTTATATATATAGCGAGGTTTACCGRATAGGGGAGCCGAGGAAACCCGAGTCTTAACTGGG	
ARNr_23s_6	(547)	AGGTTGACTGCGTACCTTTTGTATATATGGTTCAGCGACTTATATATATAGCGAGGTTTACCGRATAGGGGAGCCGAGGAAACCCGAGTCTTAACTGGG	
ARNr_23s_4	(547)	AGGTTGACTGCGTACCTTTTGTATATATGGTTCAGCGACTTATATATATAGCGAGGTTTACCGRATAGGGGAGCCGAGGAAACCCGAGTCTTAACTGGG	
23s_DDI_seq_rev	(592)	AGGTTGACTGCGTACCTTTTGTATATATGGTTCAGCGACTTATATATATAGCGAGGTTTACCGRATAGGGGAGCCGAGGAAACCCGAGTCTTAACTGGG	
ARNr_23s_5	(647)	CGTCGAGTTGCATGATATAGACCCGAAACCCCGGTGATCTAGCCATGGCCAGGTTGAAAGTTGGTAACTAACTAACTGAGGAGCCGAGACCCGACTAATGTTGA	900
ARNr_23s_3	(647)	CGTCGAGTTGCATGATATAGACCCGAAACCCCGGTGATCTAGCCATGGCCAGGTTGAAAGTTGGTAACTAACTAACTGAGGAGCCGAGACCCGACTAATGTTGA	
ARNr_23s_1	(647)	CGTCGAGTTGCATGATATAGACCCGAAACCCCGGTGATCTAGCCATGGCCAGGTTGAAAGTTGGTAACTAACTAACTGAGGAGCCGAGACCCGACTAATGTTGA	
ARNr_23s_2	(647)	CGTCGAGTTGCATGATATAGACCCGAAACCCCGGTGATCTAGCCATGGCCAGGTTGAAAGTTGGTAACTAACTAACTGAGGAGCCGAGACCCGACTAATGTTGA	
ARNr_23s_6	(647)	CGTCGAGTTGCATGATATAGACCCGAAACCCCGGTGATCTAGCCATGGCCAGGTTGAAAGTTGGTAACTAACTAACTGAGGAGCCGAGACCCGACTAATGTTGA	
ARNr_23s_4	(647)	CGTCGAGTTGCATGATATAGACCCGAAACCCCGGTGATCTAGCCATGGCCAGGTTGAAAGTTGGTAACTAACTAACTGAGGAGCCGAGACCCGACTAATGTTGA	
23s_DDI_seq_rev	(692)	CGTCGAGTTGCATGATATAGACCCGAAACCCCGGTGATCTAGCCATGGCCAGGTTGAAAGTTGGTAACTAACTAACTGAGGAGCCGAGACCCGACTAATGTTGA	
ARNr_23s_5	(747)	AAATATTAGCGGATGACCTGTGGCTGGGGGTGAAGGCCAATCAAAACCCGGAGATAGCTGGTTCTCCCGGAAATCTATTTAGTAGAGCCCTTATGTGAATA	1000
ARNr_23s_3	(747)	AAATATTAGCGGATGACCTGTGGCTGGGGGTGAAGGCCAATCAAAACCCGGAGATAGCTGGTTCTCCCGGAAATCTATTTAGTAGAGCCCTTATGTGAATA	
ARNr_23s_1	(747)	AAATATTAGCGGATGACCTGTGGCTGGGGGTGAAGGCCAATCAAAACCCGGAGATAGCTGGTTCTCCCGGAAATCTATTTAGTAGAGCCCTTATGTGAATA	
ARNr_23s_2	(747)	AAATATTAGCGGATGACCTGTGGCTGGGGGTGAAGGCCAATCAAAACCCGGAGATAGCTGGTTCTCCCGGAAATCTATTTAGTAGAGCCCTTATGTGAATA	
ARNr_23s_6	(747)	AAATATTAGCGGATGACCTGTGGCTGGGGGTGAAGGCCAATCAAAACCCGGAGATAGCTGGTTCTCCCGGAAATCTATTTAGTAGAGCCCTTATGTGAATA	
ARNr_23s_4	(747)	AAATATTAGCGGATGACCTGTGGCTGGGGGTGAAGGCCAATCAAAACCCGGAGATAGCTGGTTCTCCCGGAAATCTATTTAGTAGAGCCCTTATGTGAATA	
23s_DDI_seq_rev	(792)	AAATATTAGCGGATGACCTGTGGCTGGGGGTGAAGGCCAATCAAAACCCGGAGATAGCTGGTTCTCCCGGAAATCTATTTAGTAGAGCCCTTATGTGAATA	
ARNr_23s_5	(847)	CTTTCGGGGGTAGAGCACTGTTTCGGCTAGGGGGCCATCCCGGCTTACCACCCCGATGCAAACTGCGAATACCGAAGAGTAATGCATAGGAGACACACCGG	1100
ARNr_23s_3	(847)	CTTTCGGGGGTAGAGCACTGTTTCGGCTAGGGGGCCATCCCGGCTTACCACCCCGATGCAAACTGCGAATACCGAAGAGTAATGCATAGGAGACACACCGG	
ARNr_23s_1	(847)	CTTTCGGGGGTAGAGCACTGTTTCGGCTAGGGGGCCATCCCGGCTTACCACCCCGATGCAAACTGCGAATACCGAAGAGTAATGCATAGGAGACACACCGG	
ARNr_23s_2	(847)	CTTTCGGGGGTAGAGCACTGTTTCGGCTAGGGGGCCATCCCGGCTTACCACCCCGATGCAAACTGCGAATACCGAAGAGTAATGCATAGGAGACACACCGG	
ARNr_23s_6	(847)	CTTTCGGGGGTAGAGCACTGTTTCGGCTAGGGGGCCATCCCGGCTTACCACCCCGATGCAAACTGCGAATACCGAAGAGTAATGCATAGGAGACACACCGG	
ARNr_23s_4	(847)	CTTTCGGGGGTAGAGCACTGTTTCGGCTAGGGGGCCATCCCGGCTTACCACCCCGATGCAAACTGCGAATACCGAAGAGTAATGCATAGGAGACACACCGG	
23s_DDI_seq_rev	(892)	CTTTCGGGGGTAGAGCACTGTTTCGGCTAGGGGGCCATCCCGGCTTACCACCCCGATGCAAACTGCGAATACCGAAGAGTAATGCATAGGAGACACACCGG	
ARNr_23s_5	(947)	CGGTGCTAAACGTTTCGTCGTGAGAGGGGAAACAAACCCAGACCCGCACTAGAGTCCCAAGTTTATATTAAGTGGGAAACCAAGTGGGAGAGGCTTAGACA	1200
ARNr_23s_3	(947)	CGGTGCTAAACGTTTCGTCGTGAGAGGGGAAACAAACCCAGACCCGCACTAGAGTCCCAAGTTTATTAAGTGGGAAACCAAGTGGGAGAGGCTTAGACA	
ARNr_23s_1	(947)	CGGTGCTAAACGTTTCGTCGTGAGAGGGGAAACAAACCCAGACCCGCACTAGAGTCCCAAGTTTATTAAGTGGGAAACCAAGTGGGAGAGGCTTAGACA	
ARNr_23s_2	(947)	CGGTGCTAAACGTTTCGTCGTGAGAGGGGAAACAAACCCAGACCCGCACTAGAGTCCCAAGTTTATTAAGTGGGAAACCAAGTGGGAGAGGCTTAGACA	
ARNr_23s_6	(947)	CGGTGCTAAACGTTTCGTCGTGAGAGGGGAAACAAACCCAGACCCGCACTAGAGTCCCAAGTTTATTAAGTGGGAAACCAAGTGGGAGAGGCTTAGACA	
ARNr_23s_4	(947)	CGGTGCTAAACGTTTCGTCGTGAGAGGGGAAACAAACCCAGACCCGCACTAGAGTCCCAAGTTTATTAAGTGGGAAACCAAGTGGGAGAGGCTTAGACA	

23S_DD1_seq_rev	(192)	CGGTGCTAACGTTCTGTCGTGGAGAGGGAACACACCCAGACCCGCTAGCTAAGGTCCTCAAGTTTATATTAAGTTGGAAACCAAGTTGGAGGCTTATAGACA	1300
ARNr_23s_5	(1047)	GCTAGGATGTTGGCTTAGAACGAGCCATCATTTAAAGAAAGGTAATAGTACACTAGTCGAGTCGGCTCGCGGAGAGATGTAAACGGGGCTCAAAATATAG	1301
ARNr_23s_3	(1047)	GCTAGGATGTTGGCTTAGAACGAGCCATCATTTAAAGAAAGGTAATAGTACACTAGTCGAGTCGGCTCGCGGAGAGATGTAAACGGGGCTCAAAATATAG	
ARNr_23s_1	(1047)	GCTAGGATGTTGGCTTAGAACGAGCCATCATTTAAAGAAAGGTAATAGTACACTAGTCGAGTCGGCTCGCGGAGAGATGTAAACGGGGCTCAAAATATAG	
ARNr_23s_2	(1047)	GCTAGGATGTTGGCTTAGAACGAGCCATCATTTAAAGAAAGGTAATAGTACACTAGTCGAGTCGGCTCGCGGAGAGATGTAAACGGGGCTCAAAATATAG	
ARNr_23s_6	(1047)	GCTAGGATGTTGGCTTAGAACGAGCCATCATTTAAAGAAAGGTAATAGTACACTAGTCGAGTCGGCTCGCGGAGAGATGTAAACGGGGCTCAAAATATAG	
ARNr_23s_4	(1047)	GCTAGGATGTTGGCTTAGAACGAGCCATCATTTAAAGAAAGGTAATAGTACACTAGTCGAGTCGGCTCGCGGAGAGATGTAAACGGGGCTCAAAATATAG	
23S_DD1_seq_rev	(1092)	GCTAGGATGTTGGCTTAGAACGAGCCATCATTTAAAGAAAGGTAATAGTACACTAGTCGAGTCGGCTCGCGGAGAGATGTAAACGGGGCTCAAAATATAG	1400
ARNr_23s_5	(1147)	CACCGAAGCTCGGGCATCAGCGGCTATCCTAATATAGCCCTACGATTAACAACTTCGGAAGGAACAGACCAAGTTGGTTAAGCGGACCAACACGTTGAGTCG	1401
ARNr_23s_3	(1147)	CACCGAAGCTCGGGCATCAGCGGCTATCCTAATATAGCCCTACGATTAACAACTTCGGAAGGAACAGACCAAGTTGGTTAAGCGGACCAACACGTTGAGTCG	
ARNr_23s_1	(1147)	CACCGAAGCTCGGGCATCAGCGGCTATCCTAATATAGCCCTACGATTAACAACTTCGGAAGGAACAGACCAAGTTGGTTAAGCGGACCAACACGTTGAGTCG	
ARNr_23s_2	(1147)	CACCGAAGCTCGGGCATCAGCGGCTATCCTAATATAGCCCTACGATTAACAACTTCGGAAGGAACAGACCAAGTTGGTTAAGCGGACCAACACGTTGAGTCG	
ARNr_23s_6	(1147)	CACCGAAGCTCGGGCATCAGCGGCTATCCTAATATAGCCCTACGATTAACAACTTCGGAAGGAACAGACCAAGTTGGTTAAGCGGACCAACACGTTGAGTCG	
ARNr_23s_4	(1147)	CACCGAAGCTCGGGCATCAGCGGCTATCCTAATATAGCCCTACGATTAACAACTTCGGAAGGAACAGACCAAGTTGGTTAAGCGGACCAACACGTTGAGTCG	
23S_DD1_seq_rev	(1192)	CACCGAAGCTCGGGCATCAGCGGCTATCCTAATATAGCCCTACGATTAACAACTTCGGAAGGAACAGACCAAGTTGGTTAAGCGGACCAACACGTTGAGTCG	1500
ARNr_23s_5	(1247)	ECTGTAAAGGAGAGGAGGACACAAAGCGGGAGTGGAGGGTGAGGAATATTTAGTGTATAGCCCTGTTGGGTAGGGAGCGCTCGTGTAAAGCGGAAGAGGTGG	1501
ARNr_23s_3	(1247)	ECTGTAAAGGAGAGGAGGACACAAAGCGGGAGTGGAGGGTGAGGAATATTTAGTGTATAGCCCTGTTGGGTAGGGAGCGCTCGTGTAAAGCGGAAGAGGTGG	
ARNr_23s_1	(1247)	ECTGTAAAGGAGAGGAGGACACAAAGCGGGAGTGGAGGGTGAGGAATATTTAGTGTATAGCCCTGTTGGGTAGGGAGCGCTCGTGTAAAGCGGAAGAGGTGG	
ARNr_23s_2	(1247)	ECTGTAAAGGAGAGGAGGACACAAAGCGGGAGTGGAGGGTGAGGAATATTTAGTGTATAGCCCTGTTGGGTAGGGAGCGCTCGTGTAAAGCGGAAGAGGTGG	
ARNr_23s_6	(1247)	ECTGTAAAGGAGAGGAGGACACAAAGCGGGAGTGGAGGGTGAGGAATATTTAGTGTATAGCCCTGTTGGGTAGGGAGCGCTCGTGTAAAGCGGAAGAGGTGG	
ARNr_23s_4	(1247)	ECTGTAAAGGAGAGGAGGACACAAAGCGGGAGTGGAGGGTGAGGAATATTTAGTGTATAGCCCTGTTGGGTAGGGAGCGCTCGTGTAAAGCGGAAGAGGTGG	
23S_DD1_seq_rev	(1218)	ECTGTAAAGGAGAGGAGGACACAAAGCGGGAGTGGAGGGTGAGGAATATTTAGTGTATAGCCCTGTTGGGTAGGGAGCGCTCGTGTAAAGCGGAAGAGGTGG	1600
ARNr_23s_5	(1347)	TTTCGAGAGGGCTGCTGGACGTATCAGAGTGGGAATGCTGACATAGTAACGATATAACCGGCTGAAAACCCGTTCCGCCGGAAGACCAAGGGTTCCCTGTC	1601
ARNr_23s_3	(1347)	TTTCGAGAGGGCTGCTGGACGTATCAGAGTGGGAATGCTGACATAGTAACGATATAACCGGCTGAAAACCCGTTCCGCCGGAAGACCAAGGGTTCCCTGTC	
ARNr_23s_1	(1347)	TTTCGAGAGGGCTGCTGGACGTATCAGAGTGGGAATGCTGACATAGTAACGATATAACCGGCTGAAAACCCGTTCCGCCGGAAGACCAAGGGTTCCCTGTC	
ARNr_23s_2	(1347)	TTTCGAGAGGGCTGCTGGACGTATCAGAGTGGGAATGCTGACATAGTAACGATATAACCGGCTGAAAACCCGTTCCGCCGGAAGACCAAGGGTTCCCTGTC	
ARNr_23s_6	(1347)	TTTCGAGAGGGCTGCTGGACGTATCAGAGTGGGAATGCTGACATAGTAACGATATAACCGGCTGAAAACCCGTTCCGCCGGAAGACCAAGGGTTCCCTGTC	
ARNr_23s_4	(1347)	TTTCGAGAGGGCTGCTGGACGTATCAGAGTGGGAATGCTGACATAGTAACGATATAACCGGCTGAAAACCCGTTCCGCCGGAAGACCAAGGGTTCCCTGTC	
23S_DD1_seq_rev	(1260)	TTTCGAGAGGGCTGCTGGACGTATCAGAGTGGGAATGCTGACATAGTAACGATATAACCGGCTGAAAACCCGTTCCGCCGGAAGACCAAGGGTTCCCTGTC	1700
ARNr_23s_5	(1447)	CACGTTTAATTCGGGGCAGGGTGAGTCGGGCCCTAAGGGCAGGCTGAAGAGCGGTAGTCGATGGGAACCGGGTTAATATTCGCGTACTTGTATATATTCGGA	1701
ARNr_23s_3	(1446)	CACGTTTAATTCGGGGCAGGGTGAGTCGGGCCCTAAGGGCAGGCTGAAGAGCGGTAGTCGATGGGAACCGGGTTAATATTCGCGTACTTGTATATATTCGGA	
ARNr_23s_1	(1447)	CACGTTTAATTCGGGGCAGGGTGAGTCGGGCCCTAAGGGCAGGCTGAAGAGCGGTAGTCGATGGGAACCGGGTTAATATTCGCGTACTTGTATATATTCGGA	
ARNr_23s_2	(1446)	CACGTTTAATTCGGGGCAGGGTGAGTCGGGCCCTAAGGGCAGGCTGAAGAGCGGTAGTCGATGGGAACCGGGTTAATATTCGCGTACTTGTATATATTCGGA	
ARNr_23s_6	(1447)	CACGTTTAATTCGGGGCAGGGTGAGTCGGGCCCTAAGGGCAGGCTGAAGAGCGGTAGTCGATGGGAACCGGGTTAATATTCGCGTACTTGTATATATTCGGA	
ARNr_23s_4	(1447)	CACGTTTAATTCGGGGCAGGGTGAGTCGGGCCCTAAGGGCAGGCTGAAGAGCGGTAGTCGATGGGAACCGGGTTAATATTCGCGTACTTGTATATATTCGGA	
23S_DD1_seq_rev	(1360)	CACGTTTAATTCGGGGCAGGGTGAGTCGGGCCCTAAGGGCAGGCTGAAGAGCGGTAGTCGATGGGAACCGGGTTAATATTCGCGTACTTGTATATATTCGGA	1800
ARNr_23s_5	(1547)	TGTGGGGACGGAGTAGGTTAGTTAGTTATCGACCTGTTGGAAATGGTCGTTTAAAGTTGGTAGTGGAGCGGTTTAGGCAATTCGGACCGCTTATCAACACCCGAG	1801
ARNr_23s_3	(1546)	TGTGGGGACGGAGTAGGTTAGTTAGTTATCGACCTGTTGGAAATGGTCGTTTAAAGTTGGTAGTGGAGCGGTTTAGGCAATTCGGACCGCTTATCAACACCCGAG	
ARNr_23s_1	(1547)	TGTGGGGACGGAGTAGGTTAGTTAGTTATCGACCTGTTGGAAATGGTCGTTTAAAGTTGGTAGTGGAGCGGTTTAGGCAATTCGGACCGCTTATCAACACCCGAG	
ARNr_23s_2	(1546)	TGTGGGGACGGAGTAGGTTAGTTAGTTATCGACCTGTTGGAAATGGTCGTTTAAAGTTGGTAGTGGAGCGGTTTAGGCAATTCGGACCGCTTATCAACACCCGAG	
ARNr_23s_6	(1547)	TGTGGGGACGGAGTAGGTTAGTTAGTTATCGACCTGTTGGAAATGGTCGTTTAAAGTTGGTAGTGGAGCGGTTTAGGCAATTCGGACCGCTTATCAACACCCGAG	
ARNr_23s_4	(1547)	TGTGGGGACGGAGTAGGTTAGTTAGTTATCGACCTGTTGGAAATGGTCGTTTAAAGTTGGTAGTGGAGCGGTTTAGGCAATTCGGACCGCTTATCAACACCCGAG	
23S_DD1_seq_rev	(1460)	TGTGGGGACGGAGTAGGTTAGTTAGTTATCGACCTGTTGGAAATGGTCGTTTAAAGTTGGTAGTGGAGCGGTTTAGGCAATTCGGACCGCTTATCAACACCCGAG	1900

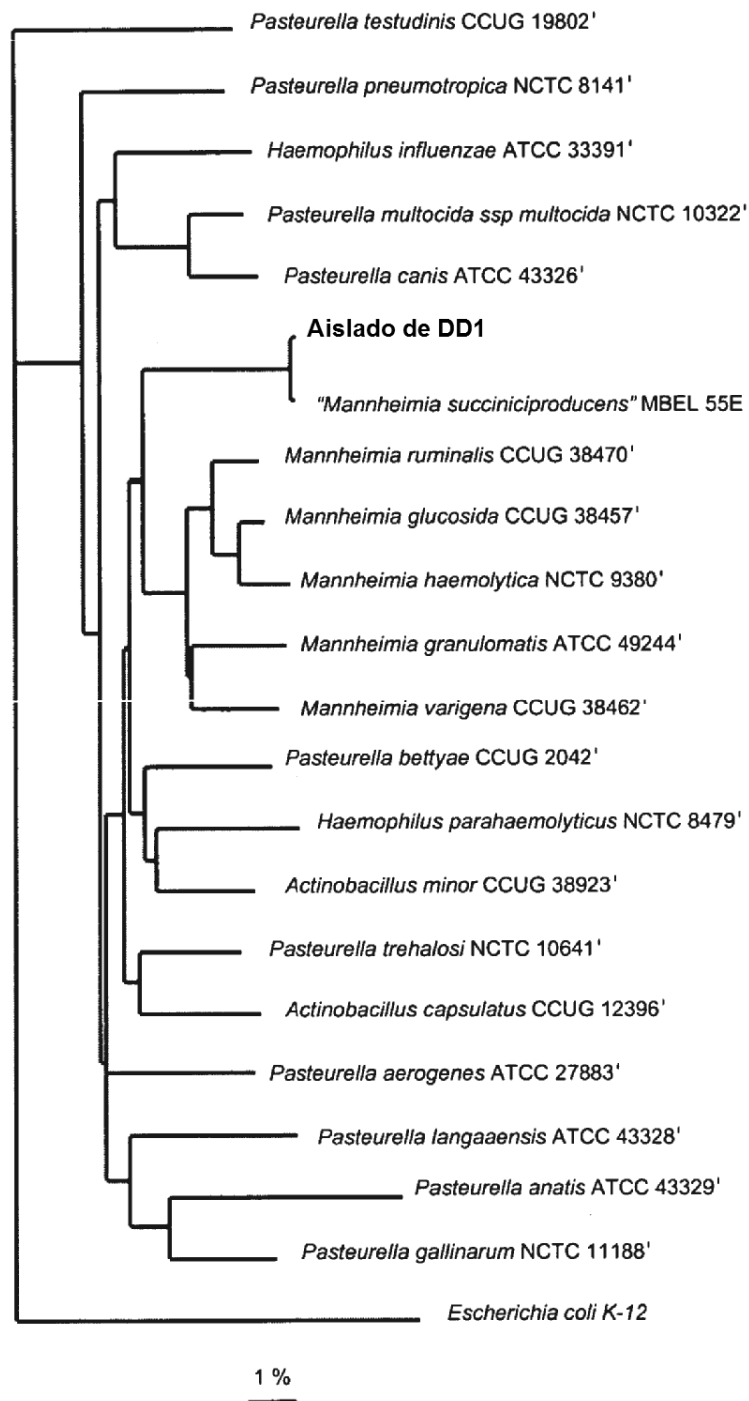
ARNr_23s_5	(1647)	AGATGATGACGAGGGCTTAAGGTGCCGAGTAAACCGATGCCACGCTTCAGAGGAAAGCCACTAAGCGTCAGATTATTAATAAACCGTACTATTAACACCGACA
ARNr_23s_3	(1646)	AGATGATGACGAGGGCTTAAGGTGCCGAGTAACCGATACCAACTCTCCAGGAAAGCCACTAAGCGTCAGATTATTAATAAACCGTACTATTAACACCGACA
ARNr_23s_1	(1647)	AGATGATGACGAGGGCTTAAGGTGCCGAGTAACCGATACCAACTCTCCAGGAAAGCCACTAAGCGTCAGATTATTAATAAACCGTACTATTAACACCGACA
ARNr_23s_2	(1646)	AGATGATGACGAGGGCTTAAGGTGCCGAGTAACCGATACCAACTCTCCAGGAAAGCCACTAAGCGTCAGATTATTAATAAACCGTACTATTAACACCGACA
ARNr_23s_6	(1647)	AGATGATGACGAGGGCTTAAGGTGCCGAGTAACCGATACCAACTCTCCAGGAAAGCCACTAAGCGTCAGATTATTAATAAACCGTACTATTAACACCGACA
ARNr_23s_4	(1647)	AGATGATGACGAGGGCTTAAGGTGCCGAGTAACCGATACCAACTCTCCAGGAAAGCCACTAAGCGTCAGATTATTAATAAACCGTACTATTAACACCGACA
ARNr_23s_DDI_seq_rev	(1560)	AGATGATGACGAGGGCTTAAGGTGCCGAGTAACCGATACCAACTCTCCAGGAAAGCCACTAAGCGTCAGATTATTAATAAACCGTACTATTAACACCGACA
ARNr_23s_5	(1747)	CAGGTGGTCAGGTAGAGAACTACTCAGGGCTTGAGAACTCGGTGAAGAACTAGGCAAAATAGCACCGTAATTCGCGGAGAAAGGTGCGCGCGGTAG
ARNr_23s_3	(1746)	CAGGTGGTCAGGTAGAGAACTACTCAGGGCTTGAGAACTCGGTGAAGAACTAGGCAAAATAGCACCGTAATTCGCGGAGAAAGGTGCGCGCGGTAG
ARNr_23s_1	(1747)	CAGGTGGTCAGGTAGAGAACTACTCAGGGCTTGAGAACTCGGTGAAGAACTAGGCAAAATAGCACCGTAATTCGCGGAGAAAGGTGCGCGCGGTAG
ARNr_23s_2	(1746)	CAGGTGGTCAGGTAGAGAACTACTCAGGGCTTGAGAACTCGGTGAAGAACTAGGCAAAATAGCACCGTAATTCGCGGAGAAAGGTGCGCGCGGTAG
ARNr_23s_6	(1747)	CAGGTGGTCAGGTAGAGAACTACTCAGGGCTTGAGAACTCGGTGAAGAACTAGGCAAAATAGCACCGTAATTCGCGGAGAAAGGTGCGCGCGGTAG
ARNr_23s_4	(1747)	CAGGTGGTCAGGTAGAGAACTACTCAGGGCTTGAGAACTCGGTGAAGAACTAGGCAAAATAGCACCGTAATTCGCGGAGAAAGGTGCGCGCGGTAG
ARNr_23s_DDI_seq_rev	(1660)	CAGGTGGTCAGGTAGAGAACTACTCAGGGCTTGAGAACTCGGTGAAGAACTAGGCAAAATAGCACCGTAATTCGCGGAGAAAGGTGCGCGCGGTAG
ARNr_23s_5	(1847)	ATTGTAGAGGTATACCCCTGAAGTTGAAACCGGTGCAAGTACCAAGCTGGCTGCAACTGTTTATTAATAAACACACAGCACCTCTGCAAAACACGAAAGTCGACG
ARNr_23s_3	(1846)	ATTGTAGAGGTATACCCCTGAAGTTGAAACCGGTGCAAGTACCAAGCTGGCTGCAACTGTTTATTAATAAACACACAGCACCTCTGCAAAACACGAAAGTGACG
ARNr_23s_1	(1847)	ATTGTAGAGGTATACCCCTGAAGTTGAAACCGGTGCAAGTACCAAGCTGGCTGCAACTGTTTATTAATAAACACACAGCACCTCTGCAAAACACGAAAGTGACG
ARNr_23s_2	(1846)	ATTGTAGAGGTATACCCCTGAAGTTGAAACCGGTGCAAGTACCAAGCTGGCTGCAACTGTTTATTAATAAACACACAGCACCTCTGCAAAACACGAAAGTGACG
ARNr_23s_6	(1847)	ATTGTAGAGGTATACCCCTGAAGTTGAAACCGGTGCAAGTACCAAGCTGGCTGCAACTGTTTATTAATAAACACACAGCACCTCTGCAAAACACGAAAGTGACG
ARNr_23s_4	(1847)	ATTGTAGAGGTATACCCCTGAAGTTGAAACCGGTGCAAGTACCAAGCTGGCTGCAACTGTTTATTAATAAACACACAGCACCTCTGCAAAACACGAAAGTGACG
ARNr_23s_DDI_seq_rev	(1760)	ATTGTAGAGGTATACCCCTGAAGTTGAAACCGGTGCAAGTACCAAGCTGGCTGCAACTGTTTATTAATAAACACACAGCACCTCTGCAAAACACGAAAGTGACG
ARNr_23s_5	(1947)	TATAGGGTGTGATGCCTGCCCGTGTGGAAGTTAATTCATGGCTTCGCAAGAGAGCGCCCTGATCGAAGCCCAAGTAAACGGCGCGGTAACTACTAT
ARNr_23s_3	(1946)	TATAGGGTGTGATGCCTGCCCGTGTGGAAGTTAATTCATGGCTTCGCAAGAGAGAGCGCCCTGATCGAAGCCCAAGTAAACGGCGCGGTAACTACTAT
ARNr_23s_1	(1947)	TATAGGGTGTGATGCCTGCCCGTGTGGAAGTTAATTCATGGCTTCGCAAGAGAGAGCGCCCTGATCGAAGCCCAAGTAAACGGCGCGGTAACTACTAT
ARNr_23s_2	(1946)	TATAGGGTGTGATGCCTGCCCGTGTGGAAGTTAATTCATGGCTTCGCAAGAGAGAGCGCCCTGATCGAAGCCCAAGTAAACGGCGCGGTAACTACTAT
ARNr_23s_6	(1947)	TATAGGGTGTGATGCCTGCCCGTGTGGAAGTTAATTCATGGCTTCGCAAGAGAGAGCGCCCTGATCGAAGCCCAAGTAAACGGCGCGGTAACTACTAT
ARNr_23s_4	(1947)	TATAGGGTGTGATGCCTGCCCGTGTGGAAGTTAATTCATGGCTTCGCAAGAGAGAGCGCCCTGATCGAAGCCCAAGTAAACGGCGCGGTAACTACTAT
ARNr_23s_DDI_seq_rev	(1860)	TATAGGGTGTGATGCCTGCCCGTGTGGAAGTTAATTCATGGCTTCGCAAGAGAGAGCGCCCTGATCGAAGCCCAAGTAAACGGCGCGGTAACTACTAT
ARNr_23s_5	(2047)	AACGGTCTTAAGGTAGCGAAATTCCTTTGTCGGGTAGTTCGACCTGCAAGTGGCAATATGATGGCCAGGCTCTCTCCACCCGAGACTCAGTGAATTT
ARNr_23s_3	(2046)	AACGGTCTTAAGGTAGCGAAATTCCTTTGTCGGGTAGTTCGACCTGCAAGTGGCAATATGATGGCCAGGCTCTCTCCACCCGAGACTCAGTGAATTT
ARNr_23s_1	(2047)	AACGGTCTTAAGGTAGCGAAATTCCTTTGTCGGGTAGTTCGACCTGCAAGTGGCAATATGATGGCCAGGCTCTCTCCACCCGAGACTCAGTGAATTT
ARNr_23s_2	(2046)	AACGGTCTTAAGGTAGCGAAATTCCTTTGTCGGGTAGTTCGACCTGCAAGTGGCAATATGATGGCCAGGCTCTCTCCACCCGAGACTCAGTGAATTT
ARNr_23s_6	(2047)	AACGGTCTTAAGGTAGCGAAATTCCTTTGTCGGGTAGTTCGACCTGCAAGTGGCAATATGATGGCCAGGCTCTCTCCACCCGAGACTCAGTGAATTT
ARNr_23s_4	(2047)	AACGGTCTTAAGGTAGCGAAATTCCTTTGTCGGGTAGTTCGACCTGCAAGTGGCAATATGATGGCCAGGCTCTCTCCACCCGAGACTCAGTGAATTT
ARNr_23s_DDI_seq_rev	(1960)	AACGGTCTTAAGGTAGCGAAATTCCTTTGTCGGGTAGTTCGACCTGCAAGTGGCAATATGATGGCCAGGCTCTCTCCACCCGAGACTCAGTGAATTT
ARNr_23s_5	(2147)	GAAATCGCCGTGAAGATGCGGTGTACCCGCGCTAGACGGAAGACCCCGTGAACCTTTCTATAGTTGACACTGAAACCTTGAAATTTTGATGTGTAGGA
ARNr_23s_3	(2146)	GAAATCGCCGTGAAGATGCGGTGTACCCGCGCTAGACGGAAGACCCCGTGAACCTTTCTATAGTTGACACTGAAACCTTGAAATTTTGATGTGTAGGA
ARNr_23s_1	(2147)	GAAATCGCCGTGAAGATGCGGTGTACCCGCGCTAGACGGAAGACCCCGTGAACCTTTCTATAGTTGACACTGAAACCTTGAAATTTTGATGTGTAGGA
ARNr_23s_2	(2146)	GAAATCGCCGTGAAGATGCGGTGTACCCGCGCTAGACGGAAGACCCCGTGAACCTTTCTATAGTTGACACTGAAACCTTGAAATTTTGATGTGTAGGA
ARNr_23s_6	(2147)	GAAATCGCCGTGAAGATGCGGTGTACCCGCGCTAGACGGAAGACCCCGTGAACCTTTCTATAGTTGACACTGAAACCTTGAAATTTTGATGTGTAGGA
ARNr_23s_4	(2147)	GAAATCGCCGTGAAGATGCGGTGTACCCGCGCTAGACGGAAGACCCCGTGAACCTTTCTATAGTTGACACTGAAACCTTGAAATTTTGATGTGTAGGA
ARNr_23s_DDI_seq_rev	(2060)	GAAATCGCCGTGAAGATGCGGTGTACCCGCGCTAGACGGAAGACCCCGTGAACCTTTCTATAGTTGACACTGAAACCTTGAAATTTTGATGTGTAGGA
ARNr_23s_5	(2247)	TAGGTGGGAGGCTTTTGAAGCGGTAAACGCGCATTCCTGTAATATACCCCTTTTAACGTTTGTATCTTAACGAGTGCCTGGGAACGGG
ARNr_23s_3	(2246)	TAGGTGGGAGGCTTTTGAAGCGGTAAACGCGCATTCCTGTAATATACCCCTTTTAACGTTTGTATCTTAACGAGTGCCTGGGAACGGG

(2247)	ARNr_23s_1	TAGTGGGAGGCTTTGAAGCGGTAAAGCCAGATTATCGTGGAGCCATCTTGAAATACCAACCCCTTTAAACGTTTGATGTTCTAACGAAGTCCCTGGAAACGGG	2501
(2246)	ARNr_23s_2	TAGTGGGAGGCTTTGAAGCGGTAAAGCCAGATTATCGTGGAGCCATCTTGAAATACCAACCCCTTTAAACGTTTGATGTTCTAACGAAGTCCCTGGAAACGGG	2601
(2247)	ARNr_23s_6	TAGTGGGAGGCTTTGAAGCGGTAAAGCCAGATTATCGTGGAGCCATCTTGAAATACCAACCCCTTTAAACGTTTGATGTTCTAACGAAGTCCCTGGAAACGGG	2701
(2247)	ARNr_23s_4	TAGTGGGAGGCTTTGAAGCGGTAAAGCCAGATTATCGTGGAGCCATCTTGAAATACCAACCCCTTTAAACGTTTGATGTTCTAACGAAGTCCCTGGAAACGGG	2801
(2160)	ARNr_23s_rev	TAGTGGGAGGCTTTGAAGCGGTAAAGCCAGATTATCGTGGAGCCATCTTGAAATACCAACCCCTTTAAACGTTTGATGTTCTAACGAAGTCCCTGGAAACGGG	2901
(2347)	ARNr_23s_5	TACTCGGACAGTGTCTGTTGGGTAGTTTACTTGGGGCGGTCTCTCTCCAAAGAGTAAAGGAGGAGGACAGAAAGTTTGTCTAAATGACCGTGGACATCGTCA	3001
(2346)	ARNr_23s_3	TACTCGGACAGTGTCTGTTGGGTAGTTTACTTGGGGCGGTCTCTCTCCAAAGAGTAAAGGAGGAGGACAGAAAGTTTGTCTAAATGACCGTGGACATCGTCA	3101
(2347)	ARNr_23s_1	TACTCGGACAGTGTCTGTTGGGTAGTTTACTTGGGGCGGTCTCTCTCCAAAGAGTAAAGGAGGAGGACAGAAAGTTTGTCTAAATGACCGTGGACATCGTCA	3201
(2346)	ARNr_23s_2	TACTCGGACAGTGTCTGTTGGGTAGTTTACTTGGGGCGGTCTCTCTCCAAAGAGTAAAGGAGGAGGACAGAAAGTTTGTCTAAATGACCGTGGACATCGTCA	3301
(2347)	ARNr_23s_6	TACTCGGACAGTGTCTGTTGGGTAGTTTACTTGGGGCGGTCTCTCTCCAAAGAGTAAAGGAGGAGGACAGAAAGTTTGTCTAAATGACCGTGGACATCGTCA	3401
(2347)	ARNr_23s_4	TACTCGGACAGTGTCTGTTGGGTAGTTTACTTGGGGCGGTCTCTCTCCAAAGAGTAAAGGAGGAGGACAGAAAGTTTGTCTAAATGACCGTGGACATCGTCA	3501
(2260)	ARNr_23s_rev	TACTCGGACAGTGTCTGTTGGGTAGTTTACTTGGGGCGGTCTCTCTCCAAAGAGTAAAGGAGGAGGACAGAAAGTTTGTCTAAATGACCGTGGACATCGTCA	3601
(2447)	ARNr_23s_5	GGTTAGTGCAAATGGTATTAAGCAAGCTTTAACTGCGGAGACGGACAAGTCGAGCAGGTGCGAAACAGAGTCAATAGTATGATCCGGTGGTCTCTGAATGGAAAGGGCC	3701
(2446)	ARNr_23s_3	GGTTAGTGCAAATGGTATTAAGCAAGCTTTAACTGCGGAGACGGACAAGTCGAGCAGGTGCGAAACAGAGTCAATAGTATGATCCGGTGGTCTCTGAATGGAAAGGGCC	3801
(2447)	ARNr_23s_1	GGTTAGTGCAAATGGTATTAAGCAAGCTTTAACTGCGGAGACGGACAAGTCGAGCAGGTGCGAAACAGAGTCAATAGTATGATCCGGTGGTCTCTGAATGGAAAGGGCC	3901
(2446)	ARNr_23s_2	GGTTAGTGCAAATGGTATTAAGCAAGCTTTAACTGCGGAGACGGACAAGTCGAGCAGGTGCGAAACAGAGTCAATAGTATGATCCGGTGGTCTCTGAATGGAAAGGGCC	4001
(2447)	ARNr_23s_6	GGTTAGTGCAAATGGTATTAAGCAAGCTTTAACTGCGGAGACGGACAAGTCGAGCAGGTGCGAAACAGAGTCAATAGTATGATCCGGTGGTCTCTGAATGGAAAGGGCC	4101
(2447)	ARNr_23s_4	GGTTAGTGCAAATGGTATTAAGCAAGCTTTAACTGCGGAGACGGACAAGTCGAGCAGGTGCGAAACAGAGTCAATAGTATGATCCGGTGGTCTCTGAATGGAAAGGGCC	4201
(2360)	ARNr_23s_rev	GGTTAGTGCAAATGGTATTAAGCAAGCTTTAACTGCGGAGACGGACAAGTCGAGCAGGTGCGAAACAGAGTCAATAGTATGATCCGGTGGTCTCTGAATGGAAAGGGCC	4301
(2547)	ARNr_23s_5	ATCGCTCAACGGATAAAGGTACTCCGGGGATATACAGGCTGATACCGCCCAAGAGTTTCAATCGACGGCGGTGTTGGCACCTCGATGTGGGCTCATCAC	4401
(2546)	ARNr_23s_3	ATCGCTCAACGGATAAAGGTACTCCGGGGATATACAGGCTGATACCGCCCAAGAGTTTCAATCGACGGCGGTGTTGGCACCTCGATGTGGGCTCATCAC	4501
(2547)	ARNr_23s_1	ATCGCTCAACGGATAAAGGTACTCCGGGGATATACAGGCTGATACCGCCCAAGAGTTTCAATCGACGGCGGTGTTGGCACCTCGATGTGGGCTCATCAC	4601
(2546)	ARNr_23s_2	ATCGCTCAACGGATAAAGGTACTCCGGGGATATACAGGCTGATACCGCCCAAGAGTTTCAATCGACGGCGGTGTTGGCACCTCGATGTGGGCTCATCAC	4701
(2547)	ARNr_23s_6	ATCGCTCAACGGATAAAGGTACTCCGGGGATATACAGGCTGATACCGCCCAAGAGTTTCAATCGACGGCGGTGTTGGCACCTCGATGTGGGCTCATCAC	4801
(2547)	ARNr_23s_4	ATCGCTCAACGGATAAAGGTACTCCGGGGATATACAGGCTGATACCGCCCAAGAGTTTCAATCGACGGCGGTGTTGGCACCTCGATGTGGGCTCATCAC	4901
(2460)	ARNr_23s_rev	ATCGCTCAACGGATAAAGGTACTCCGGGGATATACAGGCTGATACCGCCCAAGAGTTTCAATCGACGGCGGTGTTGGCACCTCGATGTGGGCTCATCAC	5001
(2647)	ARNr_23s_5	ATCCTTGGGCTGAAGTAGTCCCAAGGGTATGGCTGTTCGCCATTAAAGTGSTACGAGCTGGGTTTAAACAGCTCGTGAGACAGTTTGGTCCCTATCT	5101
(2646)	ARNr_23s_3	ATCCTTGGGCTGAAGTAGTCCCAAGGGTATGGCTGTTCGCCATTAAAGTGSTACGAGCTGGGTTTAAACAGCTCGTGAGACAGTTTGGTCCCTATCT	5201
(2647)	ARNr_23s_1	ATCCTTGGGCTGAAGTAGTCCCAAGGGTATGGCTGTTCGCCATTAAAGTGSTACGAGCTGGGTTTAAACAGCTCGTGAGACAGTTTGGTCCCTATCT	5301
(2646)	ARNr_23s_2	ATCCTTGGGCTGAAGTAGTCCCAAGGGTATGGCTGTTCGCCATTAAAGTGSTACGAGCTGGGTTTAAACAGCTCGTGAGACAGTTTGGTCCCTATCT	5401
(2647)	ARNr_23s_6	ATCCTTGGGCTGAAGTAGTCCCAAGGGTATGGCTGTTCGCCATTAAAGTGSTACGAGCTGGGTTTAAACAGCTCGTGAGACAGTTTGGTCCCTATCT	5501
(2647)	ARNr_23s_4	ATCCTTGGGCTGAAGTAGTCCCAAGGGTATGGCTGTTCGCCATTAAAGTGSTACGAGCTGGGTTTAAACAGCTCGTGAGACAGTTTGGTCCCTATCT	5601
(2560)	ARNr_23s_rev	ATCCTTGGGCTGAAGTAGTCCCAAGGGTATGGCTGTTCGCCATTAAAGTGSTACGAGCTGGGTTTAAACAGCTCGTGAGACAGTTTGGTCCCTATCT	5701
(2747)	ARNr_23s_5	GCCGTGGGCGTTGGAGAAATTGAGAGGGGCTGCTCCTTAGTACGAGAGGACCGGAGTGGACGCATCACTGGTGTTCGGTGTGTCGCCAGACAGCATTTGCCG	5801
(2746)	ARNr_23s_3	GCCGTGGGCGTTGGAGAAATTGAGAGGGGCTGCTCCTTAGTACGAGAGGACCGGAGTGGACGCATCACTGGTGTTCGGTGTGTCGCCAGACAGCATTTGCCG	5901
(2747)	ARNr_23s_1	GCCGTGGGCGTTGGAGAAATTGAGAGGGGCTGCTCCTTAGTACGAGAGGACCGGAGTGGACGCATCACTGGTGTTCGGTGTGTCGCCAGACAGCATTTGCCG	6001
(2746)	ARNr_23s_2	GCCGTGGGCGTTGGAGAAATTGAGAGGGGCTGCTCCTTAGTACGAGAGGACCGGAGTGGACGCATCACTGGTGTTCGGTGTGTCGCCAGACAGCATTTGCCG	6101
(2747)	ARNr_23s_6	GCCGTGGGCGTTGGAGAAATTGAGAGGGGCTGCTCCTTAGTACGAGAGGACCGGAGTGGACGCATCACTGGTGTTCGGTGTGTCGCCAGACAGCATTTGCCG	6201
(2747)	ARNr_23s_4	GCCGTGGGCGTTGGAGAAATTGAGAGGGGCTGCTCCTTAGTACGAGAGGACCGGAGTGGACGCATCACTGGTGTTCGGTGTGTCGCCAGACAGCATTTGCCG	6301
(2660)	ARNr_23s_rev	GCCGTGGGCGTTGGAGAAATTGAGAGGGGCTGCTCCTTAGTACGAGAGGACCGGAGTGGACGCATCACTGGTGTTCGGTGTGTCGCCAGACAGCATTTGCCG	6401
(2847)	ARNr_23s_5	GGTAGCTACATCGCGAAGAGATAAGTCTGCTGAAAGCATCTTAAGCAGCAAACTTGCCCTCGAGATGAGTTCTCCCACTATTAAATACTGTAAAGGTTGTTGGA	6501
(2846)	ARNr_23s_3	GGTAGCTACATCGCGAAGAGATAAGTCTGCTGAAAGCATCTTAAGCAGCAAACTTGCCCTCGAGATGAGTTCTCCCACTATTAAATACTGTAAAGGTTGTTGGA	6601
(2847)	ARNr_23s_1	GGTAGCTACATCGCGAAGAGATAAGTCTGCTGAAAGCATCTTAAGCAGCAAACTTGCCCTCGAGATGAGTTCTCCCACTATTAAATACTGTAAAGGTTGTTGGA	6701
(2846)	ARNr_23s_2	GGTAGCTACATCGCGAAGAGATA	

```

ARNr_23s_6      (2847) GGTAGCTACATGCGGAAGAGATAAAGTGTGTAAGCACTTAAGCACGAACTTGCTCGAGATGAGTTCTCCCACTATTAACTACTGTAAGGCTTGTGGA
ARNr_23s_4      (2847) GGTAGCTACATGCGGAAGAGATAAAGTGTGTAAGCATCTAAGCACGAACTTGCTCGAGATGAGTTCTCCCACTATTAACTACTGTAAGGCTTGTGGA
23s_DD1_seq_rev (2760) GGTAGCTACATGCGGAAGAGATAAAGTGTGTAAGCATCTAAGCACGAACTTGCTCGAGATGAGTTCTCCCACTATTAACTACTGTAAGGCTTGTGGA
3101
ARNr_23s_5      (2947) GACGACGAGGTAGATAGGCCGGGTGTGTAAGCGTTGGGAGACGTTGAGCTAACCGGTACTTAATTGCCCGAGAGGCTTAA-----3200
ARNr_23s_3      (2946) GACGACGAGGTAGATAGGCCGGGTGTGTAAGCGTTGGGAGACGTTGAGCTAACCGGTACTTAATTGCCCGAGAGGCTTAA-----
ARNr_23s_1      (2947) GACGACGAGGTAGATAGGCCGGGTGTGTAAGCGTTGGGAGACGTTGAGCTAACCGGTACTTAATTGCCCGAGAGGCTTAA-----
ARNr_23s_2      (2946) GACGACGAGGTAGATAGGCCGGGTGTGTAAGCGTTGGGAGACGTTGAGCTAACCGGTACTTAATTGCCCGAGAGGCTTAA-----
ARNr_23s_6      (2947) GACGACGAGGTAGATAGGCCGGGTGTGTAAGCGTTGGGAGACGTTGAGCTAACCGGTACTTAATTGCCCGAGAGGCTTAA-----
ARNr_23s_4      (2947) GACGACGAGGTAGATAGGCCGGGTGTGTAAGCGTTGGGAGACGTTGAGCTAACCGGTACTTAATTGCCCGAGAGGCTTAA-----
ARNr_23s_4      (2860) GACGACGAGGTAGATAGGCCGGGTGTGTAAGCGTTGGGAGACGTTGAGCTAACCGGTACTTAATTGCCCGAGAGGCTTAA-----3201
23s_DD1_seq_rev (3025) -----
ARNr_23s_5      (3025) -----
ARNr_23s_3      (3024) -----
ARNr_23s_1      (3025) -----
ARNr_23s_2      (3024) -----
ARNr_23s_6      (3025) -----
ARNr_23s_4      (3025) -----
23s_DD1_seq_rev (2960) TTGGTAGTGAAAGTTATTACGGAATAAGTAAGTAGTCAGGGAATCGGCT-----

```



```

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 cgggccagac tcctacggga ggcagcagtg gggaatattg
361 cacaatgggg ggaaccctga tgcagccatg ccgcgtgaat gaagaaggcc ttcgggttgt
421 aaagtctctt cggtgacgag gaaggtgttt gttttaatag gacaagcaat tgacgttaat
481 cacagaagaa gcaccggcta actccgtgcc agcagccgcg gtaatacggg ggggtgcgagc
541 gttaatcgga ataactgggc gtaaagggca tgcaggcgga cttttaagtg agatgtgaaa
601 gccccgggct taacctggga attgcatttc agactgggag tctagagtac tttagggagg
661 ggtagaattc cacgtgtagc ggtgaaatgc gtagagatgt ggaggaatac cgaaggcgaa
721 ggcagccctt tgggaagata ctgacgctca tatgcgaaag cgtggggagc aaacaggatt
781 agataccctg gtagtccacg cggtaaacgc tgtcgatttg gggattgggc tttaggcctg
841 gtgctcgtag ctaacgtgat aaatcgaccg cctggggagt acggccgcaa ggttaaaact
901 caaatgaatt gacggggggc cgcacaagcg gtggagcatg tggtttaatt cgatgcaacg
961 cgaagaacct tacctactct tgacatccag agaatcctgt agagatacgg gagtgccttc
1021 gggagctctg agacaggtgc tgcattggctg tcgtcagctc gtgttgatga atgttggggt
1081 aagtcccgca acgagcgcaa cccttattct ttgttgccag catgtaaaga tgggaactca
1141 aaggagactg ccggtgacaa accggaggaa ggtggggatg acgtcaagtc atcatggccc
1201 ttacgagtag ggctacacac gtgctacaat ggtgcataca gaggcgggcg ataccgcgag
1261 gtagagcgaa tctcagaaag tgcattcgtg tccggatttg agtctgcaac tcgactccat
1321 gaagtcggaa tcgctagtaa tcgcaaatac gaatgttgcg gtgaatacgt tcccgggctt
1381 tgtacacacc gcccgtcaca ccatgggagt gggttgtacc agaagtagat agcttaacct
1441 tcgggggggg cgtttaccac ggtatgattc atgactgggg tgaagtcgta acaaggtaac
1501 cgtaggggaa cctgcgg

```

Fig.2

agtaataacg	aacgacacag	gtataagaat	acttgagggt	gtatgggtta	gtgactaagc	60
gtacaagggtg	gatgccttg	caatcagagg	cgaagaagga	cgtgctaatac	tgcgaaaagc	120
ttgggtgagt	tgataagaag	cgtctaacc	aagatatccg	aatggggcaa	cccagtagat	180
gaagaatcta	ctatcaataa	ccgaatccat	aggttattga	ggcaaacgg	gagaactgaa	240
acatctaagt	accccgagga	aaagaaatca	accgagatta	cgtcagtagc	ggcgagcgaa	300
agcgtaagag	ccggcaagt	atagcatgag	gattagagga	atcggtctgg	aagccggg	360
gcacaggggtg	atagccccgt	acttgaaaat	cattgtgtgtg	tactgagctt	gcgagaagta	420
gggcgggaca	cgagaaatcc	tgtttgaaga	aggggggacc	atcctccaag	gctaaatact	480
cctgattgac	cgatagtga	ccagtactgt	gaaggaaagg	cgaaaagaac	cccgggtgag	540
ggagtgaat	agaacctgaa	accttgtagc	tacaagcagt	gggagcccg	gagggtagt	600
gcgtaccttt	tgtataatgg	gtcagcgact	tatattatgt	agcgagggtta	accgaatagg	660
ggagccgaag	gaaaccgag	tcttaactgg	gcgtcgagtt	gcatgatata	gacccgaaac	720
ccgggtgatct	agccatgggc	aggttgaagg	ttgggttaaca	ctaactggag	gaccgaaccg	780
actaatgttg	aaaaattagc	ggatgacctg	tggtctgggg	tgaaaggcca	atcaaaccgg	840
gagatagctg	gttctccccg	aaatctatct	aggtagagcc	ttatgtgaat	accttcggg	900
gtagagcact	gtttcggtta	ggggggccatc	ccggcttacc	aaccgatgc	aaactgcgaa	960
taccgaagag	taatgcatag	gagacacacg	gcgggtgcta	acgttcgtcg	tgagagggga	1020
aacaaccag	accgccagct	aaggtcccaa	agtttatatt	aagtgggaaa	cgaagtggga	1080
aggttagac	agctaggatg	ttggcttaga	agcagccatc	atttaaagaa	agcgtaatat	1140
ctcactagtc	gagtcggcct	gcgcggaaga	tgtaacgggg	ctcaaatata	gcaccgaagc	1200
tgccgcatca	ggcgtaagcc	tgttgggtag	gggagcgctg	tgtaagcgga	agaaggtggt	1260
tcgagagggc	tgctggacgt	atcacgagtg	cgaatgctga	cataagtaac	gataaaacgg	1320
gtgaaaaacc	cgttcgccgg	aagaccaagg	gttcctgtcc	aacgttaatc	ggggcaggg	1380
gagtcggccc	ctaaggcgag	gctgaagagc	gtagtcgatg	ggaaacgggt	taatattccc	1440
gtactttgta	taattgcgat	gtggggacgg	agtaggttag	gttatcgacc	tgttggaata	1500
ggtcgtttta	gttggttaggt	ggagcgttta	ggcaaatccg	gacgcttacc	aacaccgaga	1560
gatgatgacg	aggcgctaag	gtgccgaagt	aaccgatacc	acacttccag	gaaaagccac	1620
taagcgctag	attataataa	accgtactat	aaaccgacac	aggtggtcag	gtagagaata	1680
ctcaggcgct	tgagagaact	cgggtgaagg	aactaggcaa	aatagcaccg	taacttcggg	1740
agaaggtgct	ccggcgtaga	ttgtagaggt	atacccttga	aggttgaacc	ggtcgaagtg	1800
acccgctggc	tgcaactggt	tattaaaaac	acagcactct	gcaaacacga	aagtggacgt	1860
ataggggtgtg	atgcctgccc	ggtgctggaa	ggttaattga	tggtcggtatc	gcaagagaag	1920
cgctgatcg	aagccccagt	aaacggcgcg	cgtaactata	acggtcctaa	ggtagcgaaa	1980
ttccttgctg	ggtaaagttcc	gacctgcacg	aatggcataa	tgatggccag	gctgtctcca	2040
cccgagactc	agtgaatttg	aaatcgccgt	gaagatgcgg	tgtaccgcgg	gctagacgga	2100
aagaccccg	gaacctttac	tatagcttga	cactgaacct	tgaattttga	tgtgtaggat	2160
aggtgggagg	ctttgaagcg	gtaacgccag	ttatcggtga	gccatccttg	aaataccacc	2220
ctttaacgtt	tgatgttcta	acgaagtgcc	cggaaacggg	actcgacag	tgtctggttg	2280
gtagtttgac	tggggcggtc	tcctcccaa	gagtaacgga	ggagcacgaa	ggtttgctaa	2340
tgacgggtcg	acatcgtcag	gttagtgcaa	tggataaagc	aagcttaact	gcgagacgga	2400
caagtcgagc	aggtgcgaaa	gcaggtcata	gtgatccggt	ggttctgaat	ggaagggcca	2460
tcgctcaacg	gataaaaggt	actccgggga	taacaggctg	ataccgcca	agagttcata	2520
tcgacggcgg	tgtttggcac	ctcgatgtcg	gctcatcaca	tcctgggggt	gaagtaggtc	2580
caaagggtat	ggctgttcgc	cattttaaagt	ggtacgcgag	ctgggtttta	aacgtcgtga	2640
gacagtttgg	tccttatctg	ccgtggcggt	tggagaattg	agaggggctg	ctcctagtag	2700
gagaggaccg	gagtggaagc	atcactggtg	ttccgggttg	gtcgccagac	gcattgccgg	2760
gtagctacat	gcggaagaga	taagtgtctga	aagcatctaa	gcacgaaact	tgctcgaga	2820
tgagttctcc	cagtatttaa	tactgtaagg	gttgttgtag	acgacgacgt	agataggccg	2880
ggtgtgtaag	cgttcgagga	cgttgagcta	accggtacta	attgcccag	aggcttagcc	2940
atacaacgct	caagtgtttt	tggtagtgaa	agttattacg	gaataagtaa	gtagtcaggg	3000
aatcggt						3008

Fig.3

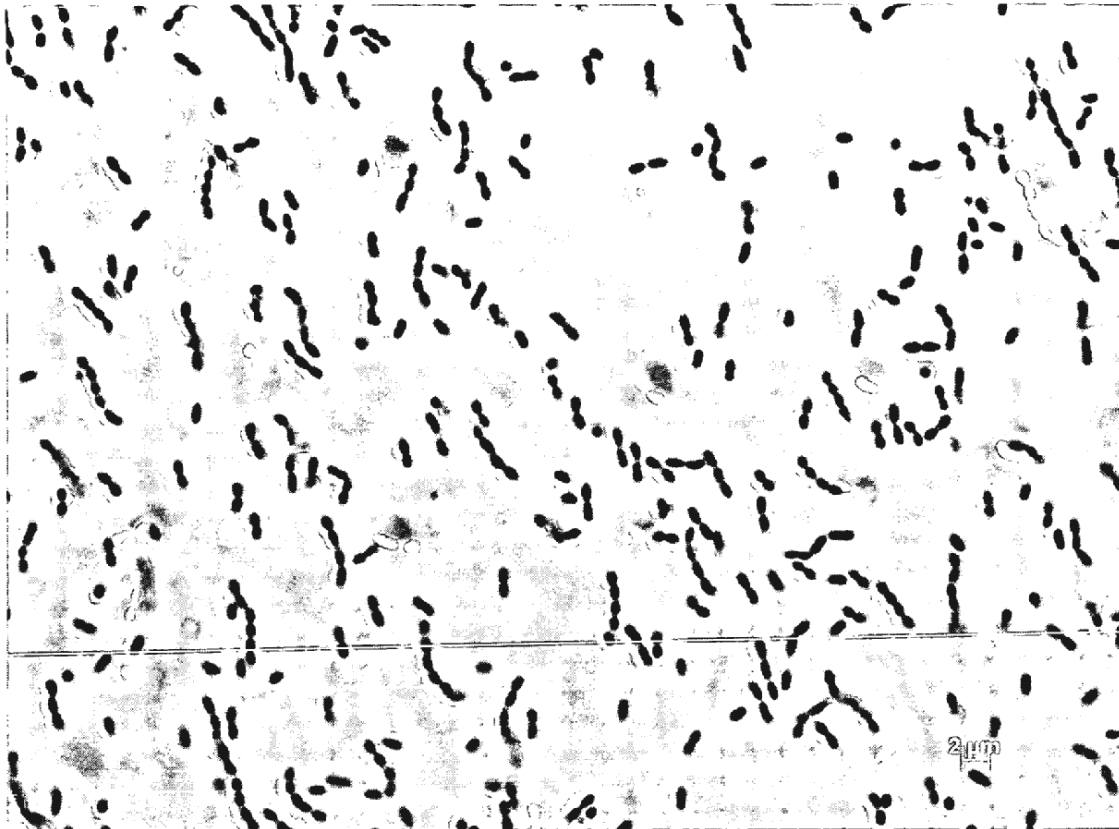


Fig.4

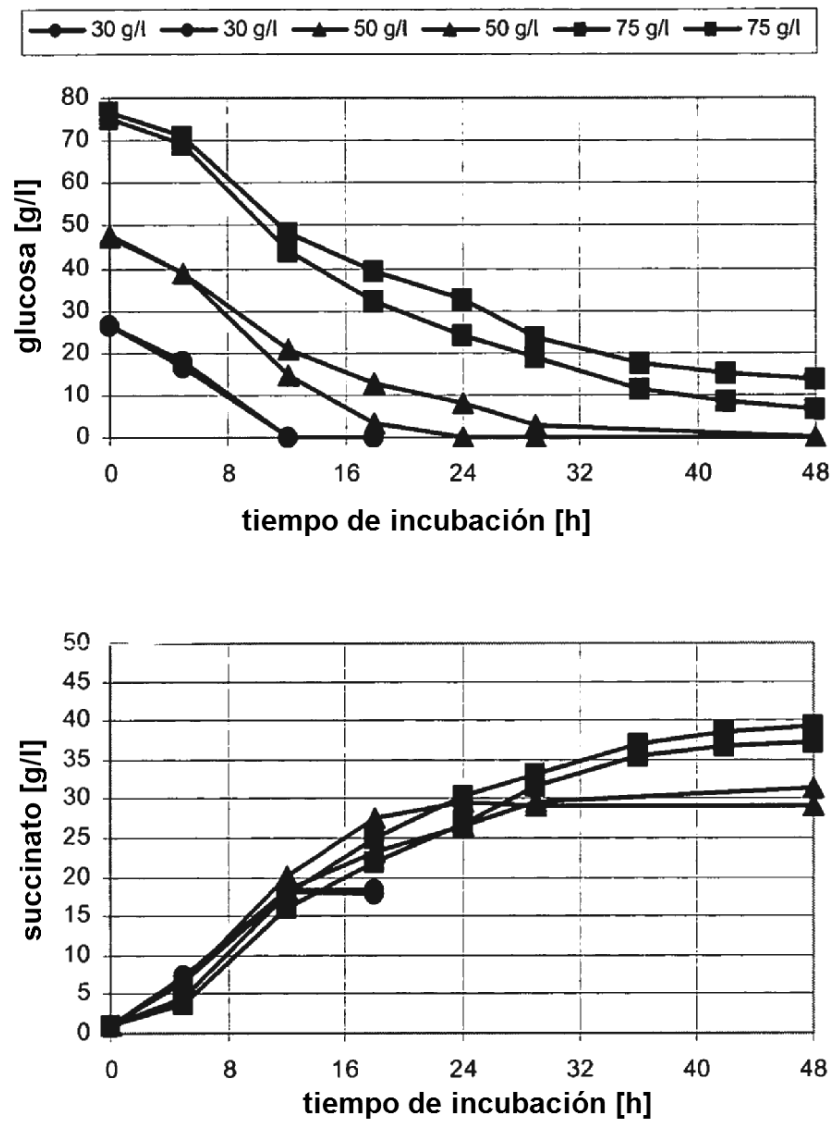


Fig.5

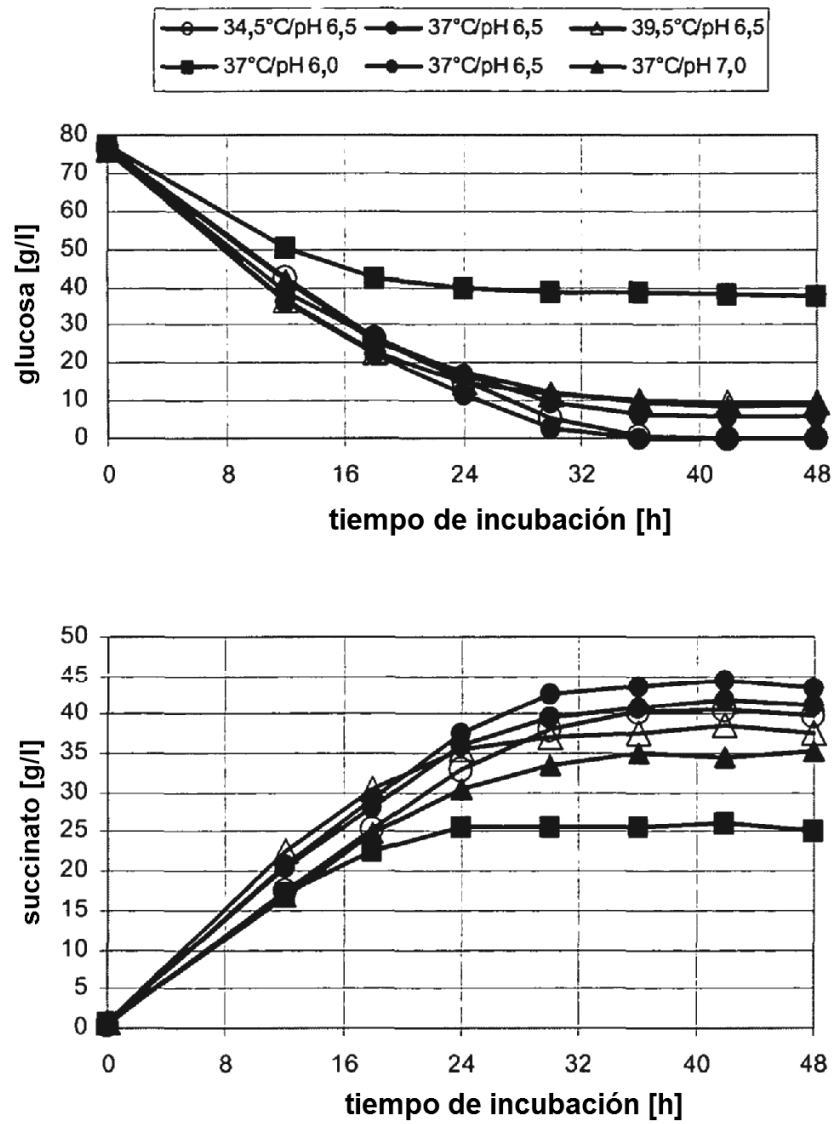


Fig.6

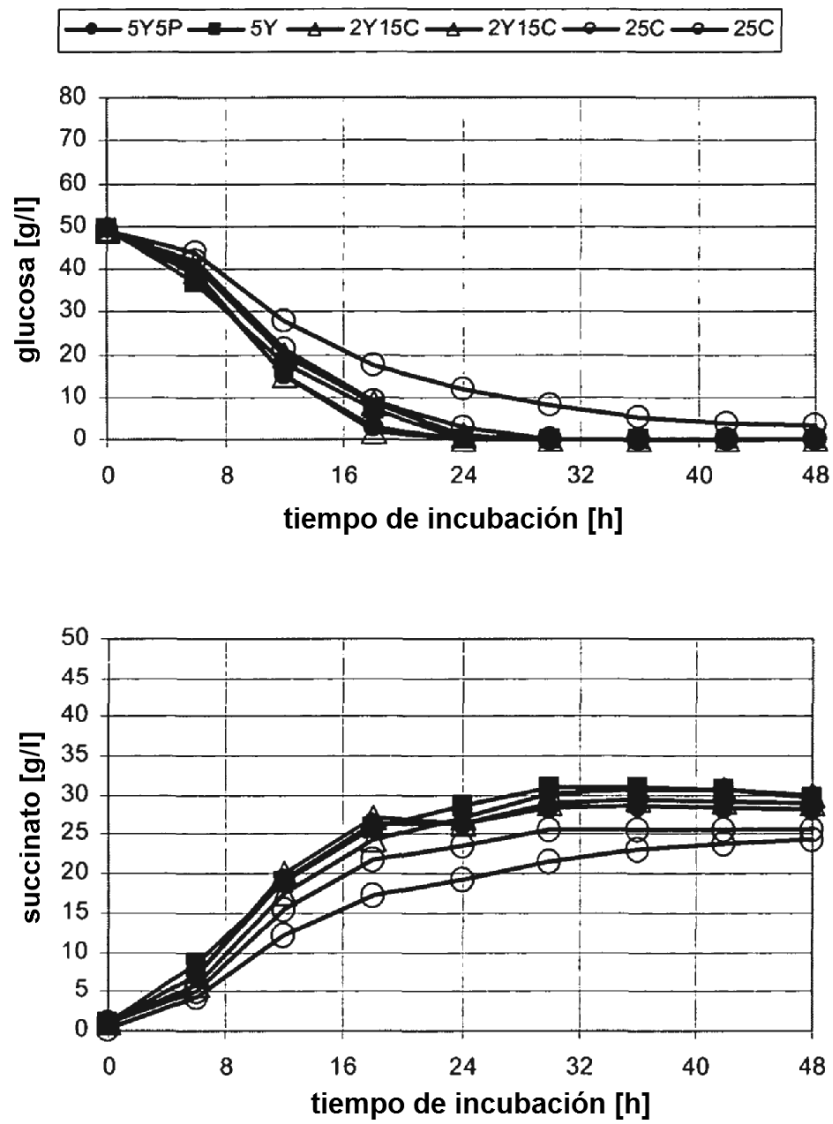


Fig.7

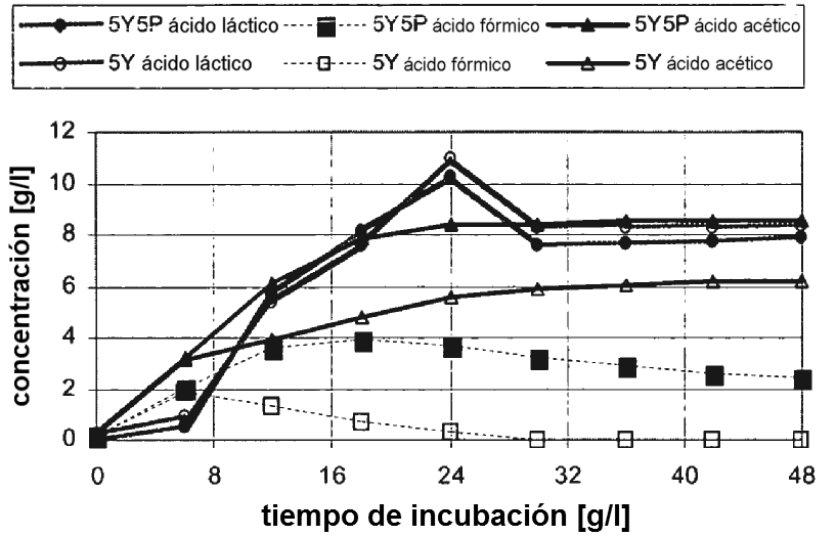


Fig.8

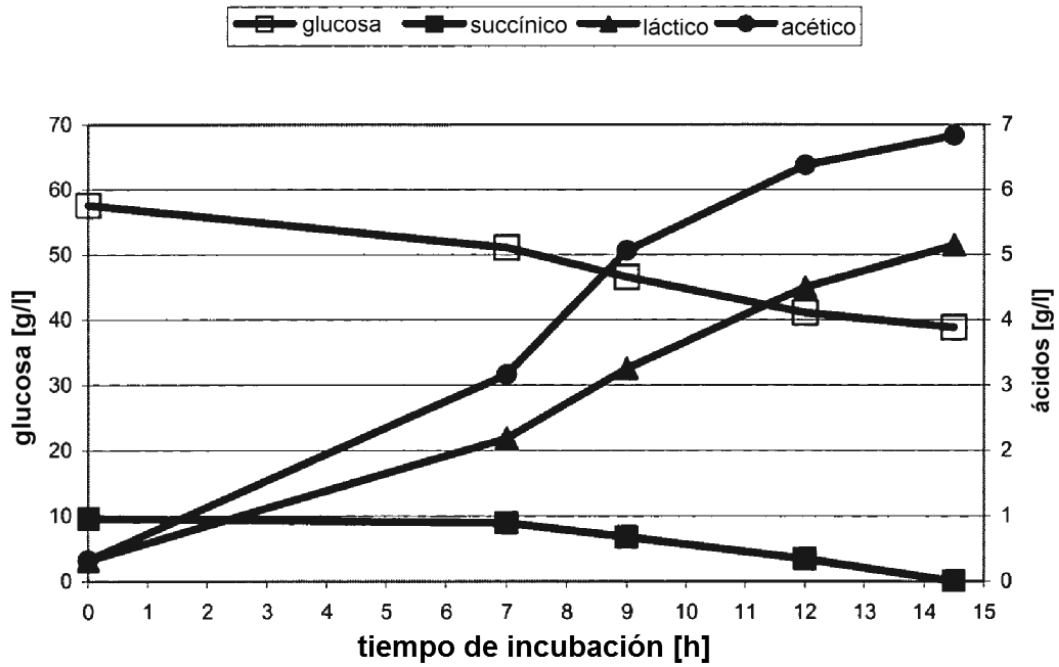


Fig.9

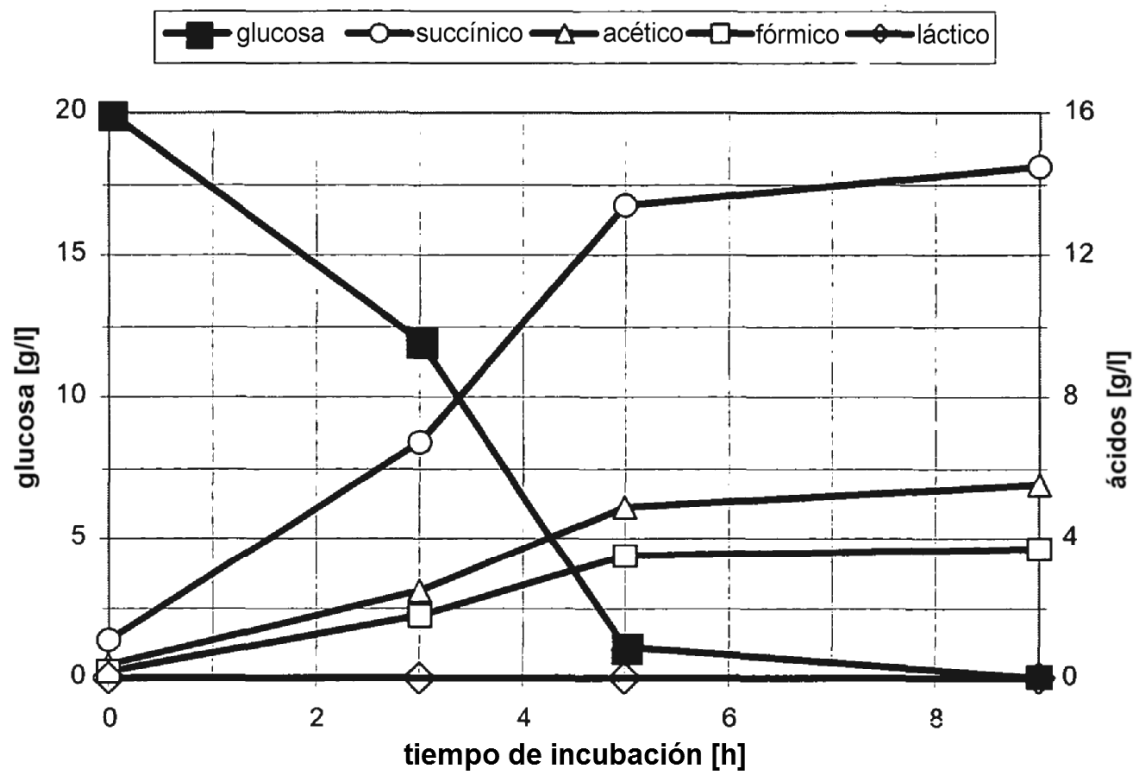


Fig.10