

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 715 930**

51 Int. Cl.:

C12N 1/32 (2006.01)

C12P 7/46 (2006.01)

C12R 1/01 (2006.01)

C12P 17/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.02.2010 PCT/EP2010/051798**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.08.2010 WO10092155**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.02.2010 E 10708150 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.12.2018 EP 2396401**

54 Título: **Productores microbianos de ácido succínico novedosos y purificación del ácido succínico**

30 Prioridad:

16.02.2009 EP 09152959

24.09.2009 US 245306 P

24.09.2009 EP 09171250

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

07.06.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**SCHRÖDER, HARTWIG;
HAEFNER, STEFAN;
ABENDROTH, GREGORY VON;
HOLLMANN, RAJAN;
RADDATZ, ALINE;
ERNST, HANSGEORG y
GURSKI, HANS**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 715 930 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

Productores microbianos de ácido succínico novedosos y purificación del ácido succínico

5 La presente invención se relaciona con cepas bacterianas, de la familia de las *Pasteurellaceae* que pertenecen a la especie *Basfia succiniciproducens*, capaces de utilizar glicerol como fuente de carbono para la producción fermentativa de ácido succínico, en el que dichas cepas se modifican genéticamente para que comprendan una desregulación de la actividad enzimática de la piruvato formato liasa endógena, así como a los procedimientos para producir ácidos orgánicos, en particular ácido succínico, haciendo uso de tal microorganismo.

Antecedentes de la invención

10 La producción fermentativa de ácido succínico (SA) a partir de biomasa ya ha llamado mucho la atención porque dicho ácido representa un componente importante de las resinas sintéticas o es una fuente de otros compuestos químicos de bajo peso molecular valiosos, en particular tetrahidrofurano (THF), 1,4-butanodiol (BDO), gamma-butirolactona (GBL) y pirrolidonas (WO-A-2006/066839).

15 Lee et al (2002a) describieron una bacteria productora de SA aislada de rumen bovino. La bacteria es un bastón Gram negativo o cocobacilo, no móvil, no formador de esporas, mesofílico y capnófilico. El análisis filogenético con base en la secuencia 16S ARNr y el análisis fisiológico indicaron que la cepa pertenece al género *Mannheimia* como una nueva especie, y se ha denominado *Mannheimia succiniciproducens* MBEL55E. Bajo condiciones de CO₂ al 100 %, crece bien en el intervalo de pH de 6,0-7,5 y produce SA, ácido acético y ácido fórmico en una proporción constante de 2:1:1. Cuando *M. succiniciproducens* MBEL55E se cultivó anaerobiamente bajo 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 SA en 7,5 horas de incubación. Además, en este microorganismo, la producción de SA mejoró mediante la mutación/eliminación de genes metabólicos. La mutación/eliminación combinada de los genes lactato deshidrogenasa *ldhA*, piruvato formato liasa *pflB*, fosfotransacetilasa *pta* y genes de acetato quinasa *ackA* dio lugar a una cepa que convierte carbono en SA con un rendimiento (YP/S) de 0,6 g SA por g de fuente de carbono añadido. El rendimiento de espacio tiempo para la producción de SA se encontró que era de 1,8 g/litro/h. (Lee 2006)

25 Lin et al 2005 describen una cepa mutante de *E. coli* con mutaciones en los genes *ldh* como también en los genes *pfl*, descritas como SB202. Sin embargo, esta cepa se caracterizó por un crecimiento lento y la incapacidad de fermentar un sacárido hasta su finalización bajo condiciones anaerobias. El *ldh* y *pfl* inactivos causaron que el flujo de carbono se embotellara en el nodo piruvato, lo que provocó que el piruvato se acumulara como el producto principal. A este respecto, se encontró que el rendimiento de carbono (YP/S) del succinato en la fuente de carbono era inferior a 0,15 g/g de SA/Carbono.

30 Sanchez et al. 2005 describen las cepas de *E. coli* que portan mutaciones en los genes *ldh*, el *adhE*, *ack-pta* e *iclR*. En estos experimentos, las células se cultivaron aeróbicamente en un medio complejo, se cosecharon, se concentraron y se incubaron con fuentes de carbono bajo condiciones anaerobias. Bajo estas condiciones específicas para la conversión directa de un carbohidrato en SA, se encontraron rendimientos de carbono YP/S de 0,98 a 1,13 g de SA por g de fuente de carbono, con un rendimiento de espacio tiempo de 0,79 g/l h SA. La utilización de carbono para la generación de biomasa antes de la fase de conversión anaerobia no se ha incluido explícitamente en este cálculo y no se describe con más detalle.

40 Hong y Lee (2001) describen cepas de *E. coli* que portan mutaciones en los genes *ldh* y *pfl*. Sin embargo, estas cepas producen SA a partir de la fermentación de carbohidratos, con una lenta utilización de los carbohidratos y bajos rendimientos de espacio tiempo y carbono (YP/S) de SA de glucosa como la fuente de carbono carbohidrato. Además, se produjeron ácido succínico, acético y láctico en una proporción de 1:0,034:1,6. En este análisis, el crecimiento de la cepa portadora de mutaciones en los genes *ldh* y *pfl* se retrasó si se compara con la cepa original no mutada.

45 Zhu et al. 2005 describen una cepa de *E. coli*, mutada en el gen *pfl* que no produjo ácido succínico sino lactato y mostró un crecimiento deficiente cuando se cultivó en glucosa como único sustrato.

Un inconveniente importante del organismo *Mannheimia succiniciproducens* es, sin embargo, su incapacidad para metabolizar el glicerol, que, como componente de los triacilgliceroles (TAGs), se vuelve fácilmente disponible, por ejemplo, como subproducto en la reacción de transesterificación de la producción de biodiesel (Dharmadi et al., 2006).

50 La producción fermentativa de SA a partir de glicerol ha sido descrita en la literatura científica (Lee et al., 2001; Dharmadi et al., 2006) y se lograron mayores rendimientos de glicerol [masa de SA producida/masa de materia prima consumida] que con azúcares comunes como glucosa (Lee et al., 2001). Sin embargo, el rendimiento espacio-tiempo obtenido con glicerol fue sustancialmente más bajo que con glucosa (0,14 frente a 1,0 g de SA/[L h]).

55 Solo en unos pocos casos se ha descrito la metabolización anaerobia de glicerol en productos de fermentación. El *E. coli* puede fermentar el glicerol bajo condiciones muy específicas, como pH ácido, evitando la acumulación del hidrógeno que es gas de fermentación y la composición del medio apropiado (Dharmadi et al 2006, Yazdani y

Gonzalez 2007). Muchos microorganismos son capaces de metabolizar el glicerol en presencia de aceptadores de electrones externos (metabolismo respiratorio), y pocos pueden hacerlo mediante fermentación (es decir, en la ausencia de aceptadores de electrones). El metabolismo fermentativo del glicerol se ha estudiado con gran detalle en varias especies de la familia *Enterobacteriaceae*, tal como *Citrobacter freundii* y *Klebsiella pneumoniae*. La disimilación del glicerol en estos organismos está estrictamente relacionada con su capacidad para sintetizar el producto muy reducido 1,3-propanodiol (1,3-PDO) (Dharmadi et al 2006). Se ha reportado la conversión de glicerol en SA usando *Anaerobiospirillum succiniciproducens* (Lee et al. 2001). Este estudio demostró que podría producirse SA con poca formación de subproducto de ácido acético utilizando glicerol como fuente de carbono, facilitando así la purificación de SA. El mayor rendimiento se obtuvo mediante la alimentación intermitente de glicerol y extracto de levadura, una estrategia que resultó en la producción de aproximadamente 19 g/l de SA. Sin embargo, se observó que los componentes nutricionales no identificados presentes en el extracto de levadura eran necesarios para que tuviera lugar la fermentación del glicerol. Sin embargo, los sacáridos, teóricamente, pueden convertirse en SA con un rendimiento significativamente más bajo que el glicerol debido al menor estado de reducción de los sacáridos en comparación con el poliol glicerol. Se ha encontrado que la combinación de sacáridos con glicerol funciona en un organismo anaerobio productor de SA (Lee et al. 2001), sin embargo, sin alcanzar los títulos de SA más allá de 29 g/l. Además, se encontró que el rendimiento de carbono YP/S era solo el 92 % y la proporción SA/AA se encontró que era de 4,9:1. Solo 4 g/l de glicerol como máximo se convirtieron en ácido succínico.

Las reacciones de carboxilación de oxaloacetato catalizadas por las enzimas fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC), fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) y piruvato carboxilasa (PycA) están utilizando HCO_3^- como una fuente de CO_2 (Peters-Wendisch, et al. PG et al 1996, 1998). Por lo tanto, las fuentes de hidrogenocarbonato tales como NaHCO_3 , KHCO_3 , NH_4HCO_3 , y demás, pueden aplicarse a medios de fermentación y cultivo para mejorar la disponibilidad de HCO_3^- en la metabolización de sustratos en SA. No se ha encontrado hasta el momento en la técnica anterior que la producción de SA a partir de glucosa sea dependiente de la adición de HCO_3^- .

La producción de biomasa por organismos anaerobios está limitada por la cantidad de ATP producida a partir de las vías de fermentación. El rendimiento de biomasa de glicerol en organismos anaerobios es inferior al de los sacáridos, como las hexosas tal como glucosa, fructosa, pentosas tal como xilosa arabinosa o disacáridos tal como sacarosa o maltosa (Lee et al. 2001, Dharmadi 2007).

La solicitud de patente anterior PCT/EP2008/006714, divulga una cepa bacteriana, siendo un miembro de la familia de *Pasteurellaceae*, originalmente aislada de rumen, y capaz de utilizar glicerol como una fuente de carbono y cepas mutantes y variantes derivadas de la misma para retener dicha capacidad, en particular, una cepa bacteriana designada DD1 como fue depositada con DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Alemania) con el número de depósito DSM 18541 (ID 06-614) y tiene la capacidad de producir ácido succínico y cepas variantes o mutantes derivadas de la retención de al menos dicha capacidad para producir ácido succínico. La cepa DD1 pertenece a la especie *Basfia succiniciproducens* y la familia de *Pasteurellaceae*, clasificada por Kuhnert et al., 2010.

Por lo tanto, existe la necesidad de nuevas cepas bacterianas, que tengan la capacidad de producir ácidos orgánicos, en particular SA, a partir de glicerol. En particular, tales cepas deberían producir dichos ácidos con alta productividad a partir del glicerol, especialmente si se trata de glicerol crudo, por ejemplo, a partir de la producción de biodiesel se puede utilizar sin purificación previa. Es un objeto de la presente invención proporcionar tales cepas novedosas y procedimientos de producción.

Sumario de la invención

Los presentes inventores, que habían aislado una cepa bacteriana, denominada DD1, resolvieron sorprendentemente dicho objeto al mutar dicha cepa, de modo que la actividad de la proteína PFL se redujo de manera que dicha cepa tiene la característica metabólica deseada. Por lo tanto, proporcionaron un procedimiento para la producción fermentativa de ácido succínico o una sal o derivado del mismo, procedimiento que comprende las etapas de:

- a. incubar una cepa bacteriana en un medio que contenga al menos glicerol como fuente de carbono asimilable y cultivar dicha cepa bajo condiciones que favorezcan la formación del ácido succínico deseado; y
- b. obtener dicho succínico o sal o derivado de este, del medio,

en el que dicha cepa bacteriana es una cepa bacteriana de la familia de *Pasteurellaceae*, capaz de utilizar glicerol como una fuente de carbono para la producción fermentativa de ácido succínico, en el que dicha cepa contiene un gen mutado que codifica una enzima piruvato formato liasa con actividad disminuida o no detectable, cuyo procedimiento comprende la producción fermentativa de ácido succínico y el control del pH con NH_4HCO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, NaOH , Na_2CO_3 , NaHCO_3 , KOH , K_2CO_3 , KHCO_3 , $\text{Mg}(\text{OH})_2$, $\text{MgH}(\text{CO}_3)_2$, $\text{Ca}(\text{OH})_2$, CaCO_3 , $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$, CaO , $\text{CH}_6\text{N}_2\text{O}_2$, $\text{C}_2\text{H}_7\text{N}$ y/o mezclas de estos.

Los presentes inventores sorprendentemente encontraron que tal cepa bacteriana mutada, que tiene la característica metabólica deseada, mostró un comportamiento técnico mejorado en gran medida en la fermentación de SA.

Breve descripción de los dibujos

- 5 La Figura 1 muestra un mapa esquemático del plásmido pSacB (SEQ ID NO:3).
- La Figura 2 muestra un mapa esquemático del plásmido pSacB (delta pfl) (SEQ ID NO:4).
- La Figura 3 muestra un mapa esquemático del plásmido pSacB (delta ldh) (SEQ ID NO:5).

Descripción detallada de la invención

a) Definición general de términos particulares:

10 El término "célula bacteriana", como se usa aquí, se refiere a un organismo procariótico, es decir, una bacteria. Las bacterias se pueden clasificar en con base en sus propiedades bioquímicas y microbiológicas, así como su morfología. Estos criterios de clasificación son bien conocidos en la técnica.

15 El término "ácido" (en el contexto de los ácidos orgánicos mono o dicarboxílicos como se menciona aquí, en particular, acético, láctico y SA) debe entenderse en su sentido más amplio y también abarca sales de estos, como por ejemplo sales de metales alcalinos, como Na y sales de K, o sales alcalinotérreas, como sales de Mg y Ca, o sales de amonio; o anhídridos de dichos ácidos.

20 "Identidad" u "homología" entre dos secuencias de nucleótidos significa la identidad de los residuos sobre toda la longitud de las secuencias alineadas, tales como, por ejemplo, la identidad calculada (para secuencias bastante similares) con la ayuda del programa *needle* del paquete de software de bioinformática EMBOSS (Versión 5.0.0, <http://emboss.sourceforge.net/what/>) con los parámetros predeterminados que son:

- gapopen (penalización para apertura de un intervalo): 10,0
- gapextend (penalización para extender un intervalo): 0,5
- datafile (archivo de matriz de puntuación incluido en el paquete): EDNAFUL

25 El término "cepa bacteriana que contiene un gen mutado que codifica una enzima piruvato formato liasa con actividad disminuida" abarca una célula bacteriana modificada que tiene una actividad disminuida o incluso ninguna actividad de PFL detectable. Los procedimientos para la detección y determinación de la actividad de PFL se pueden encontrar en Knappe et al. 1990 y Knappe 1993 y sus referencias. Además, el término abarca una célula bacteriana, que tiene una actividad de PFL reducida significativamente cuando se compara con una célula bacteriana que exhibe niveles fisiológicos de actividad de piruvato formato liasa. Si una reducción es significativa puede determinarse mediante técnicas estadísticas bien conocidos por las personas experimentadas en la técnica.

30 Las células bacterianas que son deficientes en la actividad de PFL pueden ocurrir naturalmente, es decir, debido a mutaciones espontáneas. Una célula bacteriana puede modificarse para que carezca o reducir significativamente la actividad de PFL mediante diversas técnicas. Preferiblemente, tales células bacterianas se pueden obtener mediante tratamiento químico o radiación. Para este fin, las células bacterianas serán tratadas, por ejemplo, por un agente químico mutagénico, rayos X o luz UV. En una etapa posterior, se seleccionarán aquellas células bacterianas que carecen de PFL o que tienen al menos una actividad reducida de PFL. Las células bacterianas también pueden obtenerse mediante técnicas de recombinación homóloga, que pretenden mutar, alterar o extirpar el PFL en el genoma de la célula bacteriana o introducir mutaciones que conducirán a un gen mutado que codifica una proteína con actividad disminuida. A continuación, se describe una técnica preferida para la recombinación, en particular para introducir mutaciones o para eliminar secuencias.

35 40

La definición anterior también se aplica a otros genes que codifican para otra enzima mencionada aquí, para ser modulada, en particular, cuya actividad debe morir, ser disminuida o apagada.

45 El término "actividad disminuida" incluye, por ejemplo, la expresión de un producto génico (por ejemplo, piruvato formato liasa (pfl), lactato deshidrogenasa (ldh) u otros) por dicho microorganismo genéticamente manipulado (por ejemplo, modificado genéticamente) a un nivel más bajo que lo expresado antes de la manipulación del microorganismo. La manipulación genética puede incluir, pero no se limita a, alterar o modificar secuencias reguladoras o sitios asociados con la expresión de un gen particular (por ejemplo, eliminando promotores fuertes, promotores inducibles o promotores múltiples), modificando la ubicación cromosómica de un gen particular, alterando secuencias de ácido nucleico adyacentes a un gen particular, tal como una secuencia en la región promotora que incluye secuencias reguladoras importantes para la actividad del promotor, un sitio de enlace a ribosoma o terminador de transcripción, disminuyendo el número de copias de un gen particular, modificando proteínas (por ejemplo, proteínas reguladoras, supresores, potenciadores, activadores de la transcripción y similares) involucradas en la transcripción de un gen particular y/o la traducción de un producto genético particular, o cualquier otro medio convencional para disminuir la expresión de una rutina génica particular en la técnica (incluido,

50

pero no limitado a, el uso de moléculas de ácido nucleico antisentido, u otros procedimientos para anular o bloquear la expresión de la proteína objetivo).

En particular, el gen puede manipularse para que uno o más nucleótidos se eliminen del cromosoma del organismo huésped. La actividad disminuida del producto génico, por ejemplo, de una molécula de piruvato formato liasa, también puede obtenerse introduciendo una o más mutaciones genéticas que conducen a una actividad disminuida del producto génico. La actividad disminuida puede ser una reducción de la actividad enzimática en >50 % de la actividad enzimática no mutada o no alterada, o la reducción de la actividad enzimática en >90 %, o más preferiblemente una reducción de la actividad enzimática en >95 %, o más preferiblemente una reducción de la actividad enzimática en >98 %, o incluso más preferiblemente una reducción de la actividad enzimática en ≥ 99 % o incluso más preferiblemente una reducción de la actividad enzimática en >99,9 %.

El término microorganismo "recombinante" incluye un microorganismo (por ejemplo, bacteria, célula de levadura, célula fúngica, etc.) que ha sido alterado, modificado o manipulado genéticamente (por ejemplo, manipulado genéticamente) de manera que muestre un genotipo y/o fenotipo alterado, modificado o diferente (por ejemplo, cuando la modificación genética afecta a las secuencias de ácido nucleico codificantes del microorganismo) en comparación con el microorganismo de origen natural del cual se derivó. El término "promotor" se refiere a una secuencia de ADN, que dirige la transcripción de un gen estructural para producir ARNm. Típicamente, un promotor está localizado en la región 5' de un gen, proximal al codón de inicio de un gen estructural. Si un promotor es un promotor inducible, entonces la tasa de transcripción aumenta en respuesta a un agente inductor. En contraste, la tasa de transcripción no está regulada por un agente inductor, si el promotor es un promotor constitutivo.

El término "potenciador" se refiere a un elemento promotor. Un potenciador puede aumentar la eficiencia con la que un gen particular se transcribe en el ARNm independientemente de la distancia u orientación del potenciador en relación con el sitio de inicio de la transcripción.

El término "vector de clonación" se refiere a una molécula de ADN, como un plásmido, cósmido, fagémido o bacteriófago, que tiene la capacidad de replicarse de manera autónoma en una célula huésped y que se utiliza para transformar células para la manipulación de genes. Los vectores de clonación típicamente contienen uno o un pequeño número de sitios de reconocimiento de endonucleasas de restricción en los que se pueden insertar secuencias de ADN extrañas de una manera determinable sin pérdida de una función biológica esencial del vector, así como un gen marcador, que es adecuado para su uso en la identificación y selección de células transformadas con el vector de clonación. Los genes marcadores típicamente incluyen genes que proporcionan resistencia a la tetraciclina o resistencia a la ampicilina.

El término "vector" se refiere a una molécula de ADN que comprende un gen estructural clonado que codifica una proteína extraña, que proporciona un gen en un huésped recombinante. Típicamente, en el caso de un vector destinado a la integración en el genoma del huésped, el gen clonado se coloca o se une de manera operable a ciertas secuencias corriente arriba y corriente abajo homólogas o idénticas a la secuencia genética del huésped.

El término "huésped recombinante" se refiere a un huésped que puede ser cualquier célula procariota o eucariota, que contiene un vector de clonación o un vector de expresión. Este término también pretende incluir aquellas células procariotas o eucariotas que se han modificado genéticamente para contener el gen o genes clonados en el cromosoma o genoma de la célula huésped. Para ejemplos de huéspedes adecuados, ver Sambrook et al., 1989.

Los términos "expresar", "expresando", "expresado" y "expresión" se refieren a la expresión de un producto génico (por ejemplo, una enzima biosintética de un gen de una vía o reacción definida y descrita en esta solicitud) a un nivel que la actividad enzimática resultante de esta proteína codificada para o la vía o reacción a la que se refiere permite el flujo metabólico a través de esta vía o reacción en el organismo en el que se expresa este gen/vía. La expresión se puede realizar mediante alteración genética del microorganismo que se utiliza como organismo inicial. En algunas realizaciones, un microorganismo puede ser genéticamente alterado genéticamente (por ejemplo, modificado genéticamente) para expresar un producto genético a un nivel aumentado en relación con el producido por el microorganismo inicial o en un microorganismo comparable que no ha sido alterado. La alteración genética incluye, pero no se limita a, alterar o modificar secuencias reguladoras o sitios asociados con la expresión de un gen particular (por ejemplo, agregando promotores fuertes, promotores inducibles o promotores múltiples o eliminando secuencias reguladoras de manera que la expresión sea constitutiva), modificando la ubicación cromosómica de un gen particular, alterando las secuencias de ácido nucleico adyacentes a un gen particular, como un sitio de enlace a ribosoma o terminador de transcripción, aumentando el número de copias de un gen particular, modificando proteínas (por ejemplo, proteínas reguladoras, supresoras, potenciadoras, activadores transcripcionales y similares) involucrados en la transcripción de un gen particular y/o la traducción de un producto genético particular, o cualquier otro medio convencional de desregulación de la expresión de un gen particular usando la rutina en la técnica (incluyendo, pero no limitado a, el uso de moléculas de ácido nucleico antisentido, por ejemplo, para bloquear la expresión de proteínas represoras).

Un microorganismo puede ser "alterado" o "modificado" física o ambientalmente para expresar un producto genético a un nivel mayor o menor en relación con el nivel de expresión del producto génico por el microorganismo inicial. Por ejemplo, un microorganismo puede tratarse con o cultivarse en la presencia de un agente (químico o genético)

5 conocido o sospechoso de aumentar o disminuir la transcripción y/o traducción de un gen particular y/o traducción de un producto genético particular de manera que la transcripción y/o traducción aumentan o disminuyen. Alternativamente, un microorganismo puede cultivarse a una temperatura seleccionada para aumentar o disminuir la transcripción y/o traducción de un gen particular y/o la traducción de un producto genético particular, de manera que la transcripción y/o traducción aumenten o disminuyan. "Modificado genéticamente" se refiere a un microorganismo alterado en el sentido anterior por medio de técnicas de manipulación genética disponibles en la técnica, como por ejemplo transformación, mutación, recombinación homóloga.

10 Los términos "desregular", "desregulado" y "desregulación" se refieren a la alteración o modificación de al menos un gen en un microorganismo, en los que la alteración o modificación resulta en un aumento de la eficiencia de SA en el microorganismo en relación con la producción de SA en ausencia de la alteración o modificación. En algunas realizaciones, un gen que se altera o modifica codifica una enzima en una vía biosintética o una proteína de transporte, de modo que el nivel o la actividad de la enzima biosintética en el microorganismo se altera o modifica o la especificidad o eficiencia del transporte se altera o modifica. En algunas realizaciones, al menos un gen que codifica una enzima en una vía biosintética se altera o modifica de tal manera que el nivel o la actividad de la enzima es potenciada o aumenta con relación al nivel en presencia del gen sin alterar o de tipo salvaje. La desregulación también incluye la alteración de la región de codificación de uno o más genes para producir, por ejemplo, una enzima que es resistente a la retroalimentación o tiene una actividad específica mayor o menor. Además, la desregulación abarca además la alteración genética de genes que codifican factores de transcripción (por ejemplo, activadores, represores), que regulan la expresión de genes que codifican enzimas o proteínas de transporte. Más específicamente, la desregulación puede dar como resultado una actividad enzimática "disminuida" (en la que la actividad enzimática resultante es menor que el 100 % de la actividad enzimática como es observada en el estado no desregulado es "apagada", es decir, de forma reversible o irreversible, ya no está presente o al menos ya no es detectable por una herramienta analítica convencional, como un ensayo de actividad enzimática.

25 El término "capaz de utilizar" se refiere a la capacidad de un microorganismo de la invención para convertir un sustrato, como por ejemplo glicerol en al menos un producto químico estructural y/o estéricamente diferente.

Una "actividad enzimática involucrada en o asociada con la conversión fermentativa de glicerol en succinato" significa cualquier actividad catalítica o reguladora de una enzima que influye en la conversión de glicerol en succinato y/o subproductos, como se puede determinar por uno cualquiera del conjunto de parámetros como se definen aquí a continuación.

30 Los diferentes parámetros de rendimiento como se describen aquí ("rendimiento" o YP/S; "rendimiento de productividad específico"; o rendimiento de espacio tiempo (STY)) son bien conocidos en la técnica y se determinan según lo descrito, por ejemplo, por Song y Lee. 2006.

"Rendimiento" y "YP/S" (cada uno expresado en masa del producto producido/masa de material consumido) se usan aquí como sinónimos.

35 El rendimiento de productividad específico describe la cantidad de un producto, como SA, que se produce por hora y Litro de caldo de fermentación por g de biomasa seca. La cantidad de peso de células secas declarada como DCW describe la cantidad de microorganismo biológicamente activo en una reacción bioquímica. El valor se da como g de producto por g de DCW por h (es decir, $g/gDCW^{-1} h^{-1}$).

40 El término "producción fermentativa" o "fermentación" se refiere a la capacidad de un microorganismo (asistido por la actividad de la enzima contenida en o generada por dicho microorganismo) para producir un compuesto químico en cultivo celular utilizando al menos una fuente de carbono agregada a la incubación.

El término "caldo de fermentación" se entiende que significa una solución acuosa que se basa en un procedimiento de fermentación y no se ha elaborado o se ha elaborado, por ejemplo, como se describe aquí.

b) Definición general para microorganismos diferentes

45 La "célula bacteriana" o "cepa bacteriana" a la que se hace referencia de acuerdo con la presente invención se selecciona de la familia de *Enterobacteriaceae*, *Pasteurellaceae*, Bacilli o Actinobacteria.

50 Las "*enterobacteriaceae*" representan una gran familia de bacterias, incluidas muchas de las bacterias más conocidas, como Salmonella y Escherichia coli. Pertenecen a las Proteobacterias, y se les da su propio orden (Enterobacteriales). Los miembros de las *Enterobacteriaceae* tienen forma de bastón. Al igual que otras Proteobacterias, tienen tinciones Gram negativas y son anaerobios facultativos, fermentan los azúcares para producir ácido láctico y diversos otros productos finales como el ácido succínico. La mayoría también reducen el nitrato a nitrito. A diferencia de la mayoría de las bacterias similares, las *Enterobacteriaceae* en general carecen de citocromo C oxidasa. La mayoría tienen muchos flagelos para moverse, pero algunos géneros no son móviles. No forman esporas, y en su mayoría son positivas para catalasas. Muchos miembros de esta familia son una parte normal de la flora intestinal que se encuentra en los intestinos de los humanos y otros animales, mientras que otros se encuentran en agua o suelo, o son parásitos en una variedad de diferentes animales y plantas. Escherichia coli, más conocido como E. coli, es uno de los organismos modelo más importantes, y su genética y bioquímica se han

5 estudiado atentamente. La mayoría de los miembros de *Enterobacteriaceae* tienen fimbrias peritricas de Tipo I involucradas en la adhesión de las células bacterianas a sus huéspedes. Ejemplos de las *enterobacteriaceae* son E. coli, Proteus, Salmonella, Klebsiella, "*Pasteurellaceae*" que comprenden una gran y diversa familia de Proteobacterias Gram negativas con miembros que oscilan desde bacterias tal como Haemophilus influenzae hasta comensales de la mucosa animal y humana. La mayoría de los miembros viven como comensales en las superficies mucosas de aves y mamíferos, especialmente en el tracto respiratorio superior. Las *Pasteurellaceae* típicamente tienen forma de bastón y son un grupo notable de anaerobios facultativos. Se pueden distinguir de las *Enterobacteriaceae* relacionadas, por la presencia de oxidasa, y de la mayoría de otras bacterias similares por la ausencia de flagelos. Las bacterias de la familia *Pasteurellaceae* se han clasificado en varios géneros con base en las propiedades metabólicas y las secuencias de 16S y 23SARN. Se puede encontrar una definición más precisa en las referencias de *Pasteurellaceae* en Dousse et al. 2008 y Kuhnert, P. 2008. Muchas de las *Pasteurellaceae* contienen genes de piruvato formato liasa y son capaces de fermentar anaerobiamente las fuentes de carbono en ácidos orgánicos.

15 El término "*Bacilli*" se refiere a una clase taxonómica de bacterias. Incluye dos órdenes, Bacillales y Lactobacillales. La especie de bacilo representa una bacteria cilíndrica grande (~4⁻⁸ x1,5µm) que puede crecer bajo condiciones aerobias a 37 °C. Son típicamente no patogénicos; el género Bacillales contiene las especies Alicyclobacillaceae, Bacillaceae, Caryophanaceae, Listeriaceae, Paenibacillaceae, Planococcaceae, Sporolactobacillaceae, Staphylococcaceae, Thermoactinomycetaceae, Turicibacteraceae. Muchos de los bacilli contienen genes de piruvato formato liasa y son capaces de fermentar anaerobiamente las fuentes de carbono en ácidos orgánicos.

20 El término "*Actinobacteria*" o "*Actinomycetos*" se refiere a un grupo de bacterias Gram positivas con una alta proporción de G+C. Incluyen algunos de los organismos de suelo más comunes, que juegan un papel importante en la descomposición de los materiales orgánicos. Otras actinobacterias habitan en plantas y animales, los ejemplos son Micobacterium, Corinebacterium, Nocardia, Rhodococcus y Streptomyces. Algunas actinobacterias forman filamentos ramificados, que se asemejan un poco a los micelios de los hongos no relacionados, entre los cuales se clasificaron originalmente con el nombre más antiguo de Actinomycetos. La mayoría de los miembros son aerobios, pero algunos pueden crecer bajo condiciones anaerobias. A diferencia de los Firmicutes, el otro grupo principal de bacterias Gram positivas, tienen ADN con un alto contenido de GC.

25 Las cepas bacterianas preferidas son del género "*Pasteurella*". Las bacterias del género Pasteurella son Gram negativas y anaerobias facultativas. Las especies de Pasteurella son no móviles, pleomorfas y más a menudo catalasa y oxidasa positivas (Kuhnert y Christensen, 2008, ISBN 978-1-904455-34-9). Preferiblemente, la célula bacteriana es una célula bacteriana de Pasteurella y, más preferiblemente, una célula DD1 de la cepa de Pasteurella.

30 Más preferiblemente, la cepa DD1 de Pasteurella es la cepa bacteriana depositada bajo el Tratado de Budapest con DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, GmbH), Alemania, con el número de depósito DSM 18541. Esta cepa se aisló originalmente del rumen de una vaca de origen alemán.

40 La bacteria Pasteurella se puede aislar del tracto gastrointestinal de los animales y, preferiblemente, de los mamíferos. La cepa bacteriana DD1, en particular, puede aislarse del rumen bovino y es capaz de utilizar glicerol (incluido el glicerol crudo) como fuente de carbono. Preferiblemente, la dicha cepa tiene la capacidad de producir SA a partir de glicerol (incluyendo glicerol crudo), en particular, bajo condiciones anaerobias. Además, la cepa DD1 de Pasteurella presenta al menos una de las siguientes características metabólicas adicionales:

- a) producción de SA a partir de sacarosa; en particular, bajo condiciones anaerobias;
- b) producción de ácido succínico a partir de maltosa; en particular, bajo condiciones anaerobias;
- c) producción de SA a partir de D-fructosa; en particular, bajo condiciones anaerobias;
- d) producción de SA a partir de D-galactosa; en particular, bajo condiciones anaerobias;
- 45 e) producción de SA a partir de D-manosa; en particular, bajo condiciones anaerobias;
- f) producción de SA a partir de D-glucosa; en particular, bajo condiciones anaerobias;
- g) producción de SA a partir de D-xilosa; en particular, bajo condiciones anaerobias;
- h) producción de SA a partir de L-arabinosa; en particular, bajo condiciones anaerobias;
- i) no utiliza xilitol, inositol y sorbitol;
- 50 j) crecimiento tanto bajo condiciones aerobias como anaerobias;
- k) crecimiento a concentraciones iniciales de glucosa de 75 g/l o más;
- l) tolerancia al amoníaco.

En particular, dicha cepa muestra al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o todas de las características metabólicas mencionadas. La cepa DD1 se analizó para determinar la capacidad de cometabolizar un sacárido y el poliol glicerol (PCT/EP2008/006714). Se encontró que DD1 es capaz de cometabolizar maltosa y glicerol dando como resultado la formación de biomasa, formación de SA y la utilización simultánea de maltosa y glicerol.

5 c) Realizaciones preferidas

Un primer aspecto de la divulgación se relaciona con una cepa bacteriana de la familia de Pasteurellaceae que pertenece a la especie *Basfia succiniciproducens*, capaz de utilizar glicerol como una fuente de carbono para la producción fermentativa de SA, en la que dicha cepa se modifica genéticamente para que comprenda una desregulación de su actividad endógena de la enzima piruvato formato liasa, de manera que dicha actividad de la enzima piruvato formato liasa disminuye o se apaga. Dicha bacteria mutada, que contiene una piruvato formato liasa con una actividad disminuida, puede construirse por medios genéticos, así como induciendo mutaciones al aplicar procedimientos para mutaciones bien conocidos en la literatura de la técnica anterior (ejemplos y descripciones para la modificación de genomas bacterianos se pueden encontrar en Saier, Milton H Jr 2008, Foster, Patricia L, 2007, Witkin, EM 1969, Eisenstark, A 1971, Walker, GC et al. 1983 y 1984, Botstein, D, y Shortle, D 1985 y referencias dentro de estos, es capaz de utilizar mezclas de diferentes fuentes de carbono, tales como sacáridos y glicerol; o utilizar solo glicerol. Los procedimientos para aislar cepas con mutaciones en el gen *pfl* se pueden encontrar en Varenne S et al.1975 y en Pascal, M et al. 1981.

Preferiblemente, dicha cepa tiene la capacidad de producir SA a partir de diferentes fuentes de carbono (incluido el glicerol), en particular, bajo condiciones anaerobias.

20 Opcionalmente, en dicha cepa, se desregula al menos una actividad enzimática adicional involucrada en o asociada con la conversión fermentativa de glicerol en succinato.

En particular, dicha cepa se deriva de un microorganismo de la familia de *Pasteurellaceae*, que tiene un ADNr 16S de la SEQ ID NO: 1; o una secuencia, que muestra una identidad de secuencia de al menos 96, 97, 98, 99 o 99,9 %; y/o que tiene un ADNr 23S de la SEQ ID NO: 2; o una secuencia, que muestra una identidad de secuencia de al menos 95, 96, 97, 98, 99 o 99,9 %.

Opcionalmente, la cepa bacteriana se deriva de un microorganismo de la familia de *Pasteurellaceae* y pertenece a la especie *Basfia succiniciproducens*. La especie *Basfia succiniciproducens* está definida por Kuhnert et al., 2010.

La cepa bacteriana además muestra al menos una de las siguientes características metabólicas adicionales:

- a) producción de ácido succínico a partir de sacarosa;
- 30 b) producción de ácido succínico a partir de maltosa;
- c) producción de ácido succínico a partir de maltodextrina;
- d) producción de ácido succínico a partir de D-fructosa;
- e) producción de ácido succínico a partir de D-galactosa;
- f) producción de ácido succínico a partir de D-manosa;
- 35 g) producción de ácido succínico a partir de D-glucosa;
- h) producción de ácido succínico a partir de D-xilosa;
- i) producción de ácido succínico a partir de L-arabinosa;
- j) producción de ácido succínico a partir de lactosa;
- k) producción de ácido succínico a partir de rafinosa;
- 40 l) producción de ácido succínico a partir de glicerol;
- m) crecimiento a concentraciones iniciales de glucosa de 75 g/l o más
- n) crecimiento a concentraciones iniciales de glicerol de 70 g/l o más.

como por ejemplo una combinación de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o todas de las características mencionadas, con la característica l) (glicerol->SA) como un componente obligatorio de cada una de dichas combinaciones.

Opcionalmente, la cepa de la divulgación es convertir sacarosa, maltosa, D-fructosa, D-glucosa, D-xilosa, L-arabinosa, D-galactosa, lactosa, D-manosa, rafinosa y/o glicerol en ácido succínico con un coeficiente de

ES 2 715 930 T3

rendimiento YP/S de al menos 0,5 g/g, preferiblemente 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 1,07 g/g, de al menos 1,09 g/g, de al menos 1,10 g/g, de al menos 1,11 g/g, de al menos 1,22 g/g, o de al menos 1,24 g/g.

5

Opcionalmente, la cepa de la divulgación muestra al menos una de las siguientes características

a) convertir al menos 25 g/l de glicerol en al menos 25,1 g/l de ácido succínico, con un coeficiente de rendimiento YP/S de al menos 1,01 g/g;

10

b) convertir al menos una fuente de carbono seleccionada de sacarosa, maltosa, maltodextrina, D-fructosa, D-glucosa, D-xilosa, L-arabinosa, D-galactosa, lactosa, D-manosa, rafinosa y/o glicerol en ácido succínico con un rendimiento de productividad específico de ácido succínico de al menos 0,58 g gDCW⁻¹ h⁻¹;

15

c) convertir una al menos una fuente de carbono seleccionada entre sacarosa, maltosa, D-fructosa, D-glucosa, D-xilosa, L-arabinosa, D-galactosa, lactosa, D-manosa y/o glicerol en ácido succínico con un rendimiento de espacio tiempo para ácido succínico de al menos 2,2 g/(l h) ácido succínico;

20

d) convertir al menos 25 g/l de al menos una fuente de carbono seleccionada de sacarosa, maltosa, D-fructosa, D-glucosa, D-xilosa, L-arabinosa, D-galactosa, lactosa, D-manosa y/o glicerol en ácido succínico con un rendimiento espacio-tiempo para el ácido succínico de al menos 2,2 g/(l h);

25

e) convertir al menos una fuente de carbono seleccionada de sacarosa, maltosa, maltodextrina, D-fructosa, D-glucosa, D-xilosa, L-arabinosa, D-galactosa, lactosa, D-manosa, rafinosa y/o glicerol en ácido succínico con un rendimiento de productividad específico de ácido succínico de al menos 0,58 g gDCW⁻¹ h⁻¹ y un rendimiento espacio tiempo para el ácido succínico de al menos 2,2 g/(l h).

30

Opcionalmente, la cepa bacteriana de la divulgación convierte al menos 28 g/l de glicerol en al menos 28,1 g/l de SA, 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, 28 g/l de glicerol se pueden convertir en hasta aproximadamente 40 o hasta aproximadamente 35 g/l de SA.

35

Opcionalmente, la cepa bacteriana de la divulgación convierte al menos una fuente de carbono seleccionada de sacarosa, maltosa, rafinosa, maltodextrina, D-fructosa, D-glucosa, D-xilosa, L-arabinosa, D-galactosa, D-manosa y/o glicerol en SA con un rendimiento de productividad específico de SA de al menos 0,6 g gDCW⁻¹ h⁻¹, 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 SA.

40

Opcionalmente, la cepa bacteriana de la divulgación convierte al menos una fuente de carbono seleccionada de sacarosa, maltosa, rafinosa, maltodextrina, D-fructosa, D-glucosa, D-xilosa, L-arabinosa, D-galactosa, D-manosa y/o glicerol en SA con un rendimiento de espacio tiempo para SA 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 SA.

45

Opcionalmente, la cepa bacteriana de la divulgación convierte al menos 28 g/l de al menos una fuente de carbono seleccionada de sacarosa, maltosa, rafinosa, maltodextrina, D-fructosa, D-glucosa, D-xilosa, L-arabinosa, D-galactosa, D-manosa y/o glicerol en SA con un rendimiento de espacio tiempo para SA 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).

50

Opcionalmente, la cepa bacteriana de la divulgación convierte al menos una fuente de carbono seleccionada de sacarosa, maltosa, rafinosa, maltodextrina, D-fructosa, D-glucosa, D-xilosa, L-arabinosa, D-galactosa, D-manosa y/o glicerol en SA con un rendimiento de productividad específico de SA 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, o de al menos 0,77 g gDCW⁻¹ h⁻¹ de SA, y un rendimiento espacio tiempo para SA 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).

55

Preferiblemente, dicha cepa de la divulgación puede derivarse de la cepa DD1 como fue depositada con DSMZ que tiene el número de depósito DSM 18541 o puede ser o derivarse de una variante o cepa mutante de DD1 que tiene la capacidad de producir ácido succínico.

60

Las cepas particulares de la divulgación producen ácido succínico (SA) y productos secundarios (SSP) en una proporción de SA/SSP de >10:1 o >12,5:1 o >15:1 o >17,5:1 o >20:1 o >25:1 o >30:1 o >33:1, en las que SSP representa la suma de los productos secundarios ácido láctico (LA), ácido fórmico (FA), ácido acético (AA), y ácido málico (MA), cada cantidad se expresa en g/l.

Otras cepas particulares producen ácido succínico (SA) y el producto secundario ácido acético (AA) en una proporción de SA/AA de >10:1 o >12,5:1 o >15:1 o >17,5:1 o >20:1 o >25:1 o >30:1 o >40:1 o >50:1 o >75:1 o >90:1, expresando cada cantidad en g/l.

Otras cepas particulares producen ácido succínico (SA) y el producto secundario ácido fórmico (FA) en una proporción SA/FA de >90:1 o >100:1, expresando cada cantidad en g/l.

La invención se relaciona con un procedimiento para la producción fermentativa de un ácido succínico o una sal o derivado del mismo, procedimiento que comprende las etapas de:

- 5 a) incubar una cepa bacteriana de la familia de Pasteurellaceae capaz de utilizar glicerol en un medio que contenga al menos glicerol como fuente de carbono asimilable y cultivar dicha cepa bajo condiciones que favorezcan la formación del ácido succínico deseado; y
- b) obtener dicho ácido succínico o sal o derivado del mismo a partir del medio,
- 10 en el que dicha cepa que contiene un gen mutado que codifica para una enzima de piruvato formato liasa con actividad disminuida o no detectable y
- cuyo procedimiento comprende la producción fermentativa de ácido succínico y controla el pH con NH_4HCO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, NaOH , Na_2CO_3 , NaHCO_3 , KOH , K_2CO_3 , KHCO_3 , $\text{Mg}(\text{OH})_2$, $\text{MgH}(\text{CO}_3)_2$, $\text{Ca}(\text{OH})_2$, CaCO_3 , $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$, CaO , $\text{CH}_6\text{N}_2\text{O}_2$, $\text{C}_2\text{H}_7\text{N}$ y/o mezclas de estos.
- 15 De acuerdo con un procedimiento particular, la fermentación se realiza a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 10 a 60 °C, como por ejemplo 20 a 50 °C, 30 a 45 °C, o 25 a 35 °C, y a un pH de 5,0 a 9,0, como por ejemplo 5,5 a 8, o 6 a 7, y en la presencia de dióxido de carbono.
- Dicha fuente de carbono asimilable se selecciona de glicerol, y opcionalmente sacarosa, maltosa, maltodextrina, D-fructosa, D-galactosa, D-manosa, lactosa, D-glucosa, D-xilosa, L-arabinosa, rafinosa, productos de descomposición de almidón, celulosa, hemicelulosas y lignocelulosa; y mezclas de estos.
- 20 En particular, dicha fuente de carbono es glicerol o una mezcla de glicerol y al menos una fuente de carbono adicional seleccionada de sacarosa, maltosa, D-fructosa, D-galactosa, lactosa, D-manosa, D-glucosa, D-xilosa, rafinosa y L-arabinosa.
- De acuerdo con una realización particular de dicho procedimiento, la concentración de la fuente de carbono asimilable se ajusta a un valor en un intervalo de 5 a 80 g/l, como por ejemplo 10 a 60.
- 25 La presente invención proporciona además un procedimiento para la producción fermentativa de ácido succínico o una sal o derivado del mismo, procedimiento que comprende las etapas de:
- a) incubar una cepa bacteriana de la familia de Pasteurellaceae en un medio que contenga al menos glicerol como una fuente de carbono asimilable y cultivar dicha cepa bajo condiciones que favorezcan la formación de ácido succínico;
- 30 b) obtener dicho ácido succínico o sal o derivado de este a partir del medio;
- además, se caracteriza por al menos una de las siguientes características:
- c) convertir al menos 25 g/l de glicerol en al menos 25,1 g/l de ácido succínico, con un coeficiente de rendimiento YP/S de al menos 1,0 g/g
- 35 d) convertir al menos una fuente de carbono seleccionada de sacarosa, maltosa, D-fructosa, D-glucosa, D-xilosa, L-arabinosa, D-galactosa, D-manosa, rafinosa y/o glicerol en ácido succínico con un rendimiento de productividad específico de ácido succínico de al menos 0,58 g gDCW-1 h-1;
- e) convertir al menos una fuente de carbono seleccionada de sacarosa, maltosa, D-fructosa, D-glucosa, D-xilosa, L-arabinosa, D-galactosa, lactosa, D-manosa, rafinosa y/o glicerol en ácido succínico con un rendimiento espacio tiempo para ácido succínico de al menos 2,2 g/(l h) ácido succínico;
- 40 f) convertir al menos 25 g/l de al menos una fuente de carbono seleccionada de sacarosa, maltosa, D-fructosa, D-glucosa, D-xilosa, L-arabinosa, D-galactosa, lactosa, D-manosa, rafinosa, y/o glicerol en ácido succínico con un rendimiento espacio tiempo para el ácido succínico de al menos 2,2 g/(l h);
- g) convertir al menos una fuente de carbono seleccionada de sacarosa, maltosa, D-fructosa, D-glucosa, D-xilosa, L-arabinosa, D-galactosa, lactosa, D-manosa, rafinosa y/o glicerol en ácido succínico con un rendimiento de productividad específico de ácido succínico de al menos 0,6 g gDCW-1 h-1 y un rendimiento espacio tiempo para el ácido succínico de al menos 2,2 g/(l h);
- 45 h) producir ácido succínico (SA) y productos secundarios (SSP) en una proporción SA/SSP de >10:1 o >12,5:1 o >15:1 o >17,5:1 o >20:1 o >25:1 o >30:1 o >33:1, en la que SSP representa la suma de los productos secundarios ácido láctico (LA), ácido fórmico (FA), ácido acético (AA) y ácido málico (MA), cada cantidad se expresa en g/l;
- 50

i) producir ácido succínico (SA) y el producto secundario ácido acético (AA) en una proporción SA/AA de >10:1 o > 12,5:1 o >15:1 o >17,5:1 o >20:1 o >25:1 o >30:1 o >50:1 o >75:1 o >90:1, expresando cada cantidad en g/l.

5 De acuerdo con una realización particular de dicho procedimiento, dicha cepa bacteriana es una cepa modificada genéticamente como se define anteriormente.

Los procedimientos de la invención pueden realizarse de manera discontinua o continua. El curso de la producción de ácido puede controlarse por medios convencionales, como por ejemplo análisis por HPLC o GC.

10 Preferiblemente, se produce SA bajo condiciones anaerobias. Las condiciones anaerobias pueden establecerse por medio de técnicas convencionales, como por ejemplo desgasificando los constituyentes del medio de reacción y manteniendo las condiciones anaerobias introduciendo dióxido de carbono o nitrógeno o mezclas de estos y opcionalmente hidrógeno a una rata de flujo, por ejemplo, 0,1 a 1 o 0,2 a 0,5 vvm.

Las condiciones aerobias pueden establecerse por medio de técnicas convencionales, como por ejemplo introduciendo aire u oxígeno a una rata de flujo de, por ejemplo, 0,1 a 1 o 0,2 a 0,5 vvm.

De acuerdo con la invención, puede aplicarse una ligera sobrepresión de 0,1 a 1,5 bar.

15 En otra realización, la invención proporciona un procedimiento para la producción de ácido succínico y/o sales de amonio del ácido succínico, cuyo procedimiento comprende la producción fermentativa de ácido succínico como se define anteriormente y además controla el pH con una base de amoníaco o una solución acuosa de este, o con NH_4HCO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, NaOH, Na_2CO_3 , NaHCO_3 , KOH, K_2CO_3 , KHCO_3 , $\text{Mg}(\text{OH})_2$, MgCO_3 , $\text{MgH}(\text{CO}_3)_2$, $\text{Ca}(\text{OH})_2$, CaCO_3 , $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$, CaO, $\text{CH}_6\text{N}_2\text{O}_2$, $\text{C}_2\text{H}_7\text{N}$ y/o mezclas de estos. Generalmente, la condición física de la base
20 puede ser una solución acuosa, una suspensión acuosa, gaseosa o sólida.

En una realización, el ácido succínico y/o sus sales se producen mediante uno de los procedimientos mencionados anteriormente o a continuación y se aíslan y/o purifican adicionalmente mediante las siguientes etapas:

filtración y/o centrifugación,

cromatografía de intercambio catiónico y/o

25 cristalización.

Preferiblemente, el ácido succínico y/o sus sales se aíslan y/o purifican adicionalmente mediante las siguientes etapas:

filtración, seguida de

cromatografía de intercambio catiónico, seguida de

30 cristalización.

La filtración se puede usar para separar las células bacterianas del líquido que contiene ácido succínico. La filtración puede ser una diafiltración, filtración de flujo cruzado y/o ultrafiltración.

35 El material utilizado para la cromatografía de intercambio catiónico puede ser una resina de intercambio catiónico de ácido fuerte. Una resina de intercambio catiónico de ácido fuerte porta, por ejemplo, grupos de ácido sulfónico. En particular, el material utilizado para la cromatografía de intercambio catiónico puede ser un copolimerizado de estiroldivinilbenzol que porta grupos de ácido sulfónico en la forma H^+ . La forma H^+ significa que los grupos de ácido sulfónico están presentes en la forma ácida. Preferiblemente, el tamaño de partícula promedio de la resina de cromatografía de intercambio catiónico es 0,3 a 1,5, más preferiblemente 0,55 a 0,75 mm y/o la densidad aparente es de 700 a 800 g/l. La resina de cromatografía de intercambio catiónico puede ser macroporosa. Macroporosa
40 significa que preferiblemente el diámetro de poro promedio de la resina de intercambio catiónico es desde 20 a 120 nm, preferiblemente desde 20 a 100 nm y más preferiblemente desde 20 a 40 nm. La distribución de partículas es preferiblemente monodispersa. Preferiblemente, la capacidad total del material de cromatografía de intercambio catiónico es 0,5 a 2,0, más preferiblemente 0,8 a 1,7, más preferiblemente 1,0 a 1,5, más preferiblemente 1,4 a 1,9 min eq./l x eq./l significa que 1 l de resina de intercambio catiónico porta x mol de grupos de ácido sulfónico. Por
45 consiguiente, la eq./l se calcula con respecto a una única molécula cargada. La sal de ácido succínico a purificar puede ser una sal de Na, K, Ca, Mg y/o amonio. Por ejemplo, la resina de intercambio catiónico de ácido fuerte puede ser Type Lewatit Monoplus SP 112 de Lanxess.

Preferiblemente, la cromatografía de intercambio catiónico se realiza a una temperatura desde 20 a 60 °C, más preferiblemente desde 45 a 60 °C.

50 Otros procedimientos preferidos para producir SA se describen a continuación:

Procedimiento 1:

En otra realización, la presente invención proporciona un procedimiento para la producción fermentativa de SA o una sal o derivado de este, procedimiento que comprende las etapas de:

- 5 a. incubar una cepa bacteriana de la familia de Pasteurellaceae en un medio que contenga al menos glicerol como fuente de carbono asimilable y cultivar dicha cepa bajo condiciones que favorezcan la formación del ácido succínico deseado;
- b. obtener dicho ácido succínico o sal o derivado de este a partir del medio;

10 y tal procedimiento se caracteriza adicionalmente por la conversión de al menos 50 g/l de glicerol en al menos 50 g/l de SA, 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, 50 g/l de glicerol se pueden convertir en hasta aproximadamente 65 o hasta 62,5 g/l de SA o hasta 60 g/l de SA.

15

Procedimiento 2:

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

- 20 a. incubar una cepa bacteriana de la familia Pasteurellaceae con una enzima piruvato formato liasa con actividad disminuida en un medio que contiene al menos glicerol como fuente de carbono asimilable y cultivar dicha cepa bajo condiciones que favorecen la formación del ácido succínico deseado;
- b. obtener dicho ácido succínico o sal o derivada del mismo a partir del medio;

y tal procedimiento se caracteriza adicionalmente por

25 la conversión de una fuente de carbono seleccionada de sacarosa, maltosa, maltodextrina, rafinosa, D-fructosa, D-glucosa, D-xilosa, L-arabinosa, D-galactosa, D-manosa y/o glicerol en SA con un rendimiento de productividad específico de SA de al menos 0,42 g gDCW⁻¹ h⁻¹ o de al menos 0,45 o de al menos 0,47 g gDCW⁻¹ h⁻¹ de SA, o de al menos 0,49 g gDCW⁻¹ h⁻¹ de SA.

Procedimiento 3:

30 En otra realización, la presente invención proporciona un procedimiento para la producción fermentativa de SA o una sal o derivado de este, procedimiento que comprende las etapas de:

- a. incubar una cepa bacteriana de la familia Pasteurellaceae con una enzima piruvato formato liasa con actividad disminuida en un medio que contiene al menos glicerol como fuente de carbono asimilable y cultivar dicha cepa bajo condiciones que favorecen la formación del ácido succínico deseado;
- b. obtener dicho ácido succínico o sal o derivada de este a partir del medio;

35 y cuyo procedimiento se caracteriza adicionalmente por la conversión de una fuente de carbono seleccionada de sacarosa, maltosa, maltodextrina, rafinosa, D-fructosa, D-glucosa, D-xilosa, L-arabinosa, D-galactosa, D-manosa y/o glicerol en SA con un rendimiento de espacio tiempo para SA de al menos 2,22 g/(l h), o de al menos 2,5, al menos 2,75, al menos 2,9, g/(L*h) SA.

Procedimiento 4:

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

- a. incubar una cepa bacteriana de la familia de Pasteurellaceae en un medio que contiene al menos glicerol como fuente de carbono asimilable y cultivar dicha cepa bajo condiciones que favorecen la formación del ácido succínico deseado;
- 45 b. obtener dicho ácido succínico o sal o derivado de este a partir del medio;

y cuyo procedimiento se caracteriza adicionalmente por la conversión de al menos 50 g/l de una fuente seleccionada de sacarosa, maltosa, maltodextrina, rafinosa, D-fructosa, D-glucosa, D-xilosa, L-arabinosa, D-galactosa, D manosa, y/o glicerol en SA con un rendimiento de espacio tiempo para SA 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).

Procedimiento 5:

En otra realización, la presente invención proporciona un procedimiento para la producción fermentativa de SA o una sal o derivado de este, procedimiento que comprende las etapas de:

- 5 a. incubar una cepa bacteriana de la familia de Pasteurellaceae en un medio que contiene al menos glicerol como fuente de carbono asimilable y cultivar dicha cepa bajo condiciones que favorecen la formación del ácido succínico deseado;
- b. obtener dicho ácido succínico o sal o derivado de este a partir del medio;

10 y cuyo procedimiento se caracteriza adicionalmente por la conversión de una fuente de carbono seleccionada de sacarosa, maltosa, maltodextrina, rafinosa, D-fructosa, D-glucosa, D-xilosa, L-arabinosa, D-galactosa, D-manosa y/o glicerol en SA con un rendimiento de productividad específico de SA de al menos $0,6 \text{ g gDCW}^{-1} \text{ h}^{-1}$ o de al menos $0,65$ o de al menos $0,7 \text{ g gDCW}^{-1} \text{ h}^{-1}$ SA, o de al menos $0,75 \text{ g gDCW}^{-1} \text{ h}^{-1}$ SA, o de al menos $0,77 \text{ g gDCW}^{-1} \text{ h}^{-1}$ SA y un rendimiento de espacio tiempo para SA de al menos $2,2 \text{ g/(l h)}$, o de al menos $2,5$, al menos $2,75$, al menos 3 , al menos $3,25$, al menos $3,5$ o al menos $3,7 \text{ g/(L*h)}$.

15 En otra realización de los procedimientos 1 a 5 identificados anteriormente para producir SA, la fuente de carbono es glicerol o una mezcla de glicerol y al menos otra fuente de carbono seleccionada de sacarosa, maltosa, rafinosa, maltodextrina, D-fructosa, D-galactosa, D-manosa, D-glucosa, D-xilosa y L-arabinosa.

Las condiciones particularmente adecuadas para producir SA son:

Fuente de carbono: glucosa, xilosa, maltosa o maltodextrina, rafinosa y/o glicerol (incluido glicerol crudo)

Temperatura: 30 a $45 \text{ }^\circ\text{C}$

20 pH: $5,5$ a $7,0$, controlado por una base como se describe anteriormente, preferiblemente por una fuente de HCO_3^- tal como Na_2CO_3 , NaHCO_3 , $\text{Mg}(\text{HCO}_3)_2$, $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$ o $\text{Mg}(\text{OH})_2$, MgCO_3 , $\text{Ca}(\text{OH})_2$, CaCO_3 .

gas suministrado: CO_2

25 El SA y/o las sales de SA producidas se pueden aislar de manera convencional mediante procedimientos conocidos en la técnica, como por ejemplo cristalización, filtración, electrodiálisis, cromatografía. Por ejemplo, pueden aislarse precipitándose como un producto de succinato de calcio en el fermentador durante la fermentación utilizando hidróxido u óxido de calcio, carbonato o hidrogenocarbonato para neutralizar y filtrar el precipitado. El producto SA deseado se recupera del succinato de calcio precipitado por acidificación del succinato con ácido sulfúrico, seguido de filtración para eliminar el sulfato de calcio (yeso) o los precipitados. La solución resultante puede purificarse adicionalmente por medio de cromatografía de intercambio iónico con el fin de eliminar los iones residuales no deseados.

30 En otra realización, la presente invención proporciona un procedimiento para la producción de tetrahidrofurano (THF) y/o 1,4-butanodiol (BDO) y/o gamma-butirolactona (GBL), que comprende

- b) la producción fermentativa de ácido succínico y/o sales de ácido succínico, como se definió anteriormente, y
- 35 b1) ya sea la hidrogenación catalítica directa del ácido libre obtenido en THF y/o BDO y/o GBL o
- b2) la esterificación química de ácido succínico libre y/o las sales de ácido succínico obtenidas, en su correspondiente éster dialquilo inferior y la subsiguiente hidrogenación catalítica de dicho éster en THF y/o BDO y/o GBL.

También se divulga un procedimiento para la producción de pirrolidonas que comprende

- 40 a) la producción fermentativa de sales de amonio de ácido succínico como se definió anteriormente, y
- b) la conversión química de las sales de amonio del ácido succínico en pirrolidonas de una manera conocida per se.

45 En una realización particular de los procedimientos de dicho glicerol, que se utiliza como fuente de carbono asimilable, es glicerol crudo, en particular obtenido por escisión con éster de triacilglicéridos. Por ejemplo, glicerol es un producto de desecho como se obtiene de la fabricación de biodiesel.

La presente invención también se relaciona con el uso de una cepa bacteriana como se define anteriormente para la producción fermentativa de un producto químico orgánico fino, como por ejemplo ácido succínico o una sal o un derivado de este.

d) Otras realizaciones particulares

d1) manipulaciones genéticas

Opcionalmente, la cepa bacteriana de la invención contiene un gen que codifica una enzima mutada de la enzima piruvato formato liasa (pfl), ya que su actividad enzimática está definida por el número EC EC 2.3.1.54. Por ejemplo, la actividad de la enzima pfl está influenciada negativamente por las mutaciones en el gen pflA o al afectar la regulación de expresión del gen pflA. La secuencia del gen pflA y el producto del gen pflA se puede encontrar en los siguientes números de acceso. GenelID:6268899, YP_001880903: los homólogos de este gen se conocen bajo los números de acceso: NCBI-GeneID 945514, 945444, 947623, 948454, 3075405, las proteínas respectivas bajo los números de acceso: UniProt: P09373, P75793, P42632, P32674, Q65VK2.

También dentro del alcance de esta divulgación están los genes que codifican las enzimas activadoras de piruvato formato liasa que están definidas por el número de EC EC 1.97.1.4 y se describen en Knappe et al. 1990 y 1993 con actividad disminuida o desregulada. Esto se puede realizar mediante la introducción de mutaciones o eliminaciones de genes mediante los procedimientos descritos en esta invención. Los ejemplos para esta enzima cuyas actividades pueden disminuirse o cuyo gen codificador puede mutarse o desregularse están codificados por pflA, el gen de la enzima activadora de pfl y el gen yfiD, el gen K12 de E. coli conocido bajo el número de acceso GenelID: 947068, el gen ybiY, con el número de acceso NCBI-GeneID: 945445 y la proteína respectiva NP_415345, el gen de Mannheimia succiniproducens conocido bajo el número de acceso GenelID: AAU37008, las proteínas respectivas bajo el número de acceso YP_087593, NP_417074 y YP_087564, así como los homólogos de este gen. Se describen los números de acceso de las secuencias de genes no mutadas que están sujetas a mutaciones o eliminaciones descritas en esta invención.

También en el alcance de esta divulgación están las cepas que muestran una actividad reducida de la proteína arcA, por ejemplo número de acceso: ECK4393 (también conocido bajo las siguientes descripciones: cpxC, fexA, sfrA, msp) o fnr que portan mutaciones genéticas para el gen respectivo, conocido bajo el número de acceso NCBI-GeneID: 948874 para arcA o NCBI-GeneID: 945908 para fnr. Las secuencias de proteínas respectivas se pueden encontrar bajo el número de acceso P0A9E5. Se conocen genes similares para otros organismos tales como específicamente Mannheimia succiniproducens. NCBI-GeneID: 3076294 y la proteína respectiva YP_088696 para arcA y para fnr NCBI-GeneID: 3075449 y UniProt: Q65TM6.

También en el alcance de esta divulgación están las cepas que muestran una actividad reducida del lactato deshidrogenasa definido por el número de EC EC 1.1.1.27 y EC 1.1.1.28 que codifican para enzimas con una especificidad de producir ácido D-láctico o L-láctico o ambos. Ejemplos son los genes de E. coli NCBI-GeneID: 946315 y la proteína respectiva NP_415898 o el gen M succiniproducens NCBI-GeneID: 3075603 y la proteína respectiva YP_089271.

Opcionalmente, la cepa bacteriana de la divulgación contiene

(1) un gen mutado que codifica una enzima piruvato formato liasa definida por la nomenclatura EC como EC 2.3.1.54, con actividad disminuida; y/o (2) un gen mutado que codifica la enzima activadora de piruvato formato liasa definida por la nomenclatura EC como EC 1.97.1.4 con actividad disminuida; y/o (3) un gen mutado que codifica la proteína arcA y/o (4) un gen mutado que codifica una lactato deshidrogenasa definida por la nomenclatura EC como EC 1.1.1.27 o EC 1.1.1.28 con actividad disminuida.

Un procedimiento particular para preparar cepas bacterianas modificadas genéticamente de la divulgación es una técnica que también a veces se denomina aquí como la "recombinación de Campbell" (Leenhouts et al., 1989, Appl Env Microbiol 55, 394-400). "Campbell entrante", como se usa aquí, se refiere a la preparación de un transformante de una célula huésped original en la que una molécula de ADN de doble cadena circular completa (por ejemplo, un plásmido) se ha integrado en un cromosoma mediante un único evento de recombinación homólogo (un evento de cruce entrante), y que resulta efectivamente en la inserción de una versión linealizada de dicha molécula de ADN circular en una primera secuencia de ADN del cromosoma que es homóloga a una primera secuencia de ADN de dicha molécula de ADN circular. "Entrante según Campbell" se refiere a la secuencia de ADN linealizada que se ha integrado en el cromosoma de un transformante "Campbell entrante". Un "Campbell entrante" contiene una duplicación de la primera secuencia de ADN homóloga, cada copia de la cual incluye y rodea una copia del punto de cruce de la recombinación homóloga.

"Campbell saliente", como se usa aquí, se refiere a una célula que desciende de un transformante "Campbell entrante", en el que se produjo un segundo evento de recombinación homólogo (un evento de cruce saliente) entre una segunda secuencia de ADN que está contenida en el ADN insertado linealizado del ADN "entrante según Campbell", y una segunda secuencia de ADN de origen cromosómico, que es homóloga a la segunda secuencia de ADN de dicho inserto linealizado. El segundo evento de recombinación da como resultado la eliminación (desechar) de una porción de la secuencia de ADN integrada, pero, lo que es más importante, también resulta en una porción (que puede ser tan pequeña como una base única) del ADN "entrante según Campbell" integrado que permanece en el cromosoma, de manera que, en comparación con la célula huésped original, la célula "Campbell saliente" contiene uno o más cambios intencionales en el cromosoma (por ejemplo, una eliminación de la secuencia de ADN, sustitución de una única base, sustitución de múltiples bases, inserción de un gen heterólogo o secuencia de ADN,

inserción de una copia adicional o copias de un gen homólogo o un gen homólogo modificado, o inserción de una secuencia de ADN que comprende más de uno de los ejemplos enumerados mencionados anteriormente).

Una célula "Campbell saliente" se obtiene, preferiblemente, mediante una contraselección contra un gen que está contenido en una porción (la porción que se desea desechar) de la secuencia de ADN "entrante según Campbell", por ejemplo, el gen *sacB* de *Bacillus subtilis*, que es letal cuando se expresa en una célula que crece en presencia de aproximadamente 5 % a 10 % de sacarosa. Ya sea con o sin una contraselección, se puede obtener o identificar una célula "Campbell saliente" deseada mediante la detección de la célula deseada, utilizando cualquier fenotipo que se pueda cribar, como, pero sin limitarse a, morfología de la colonia, color de la colonia, presencia o ausencia de la resistencia a los antibióticos, presencia o ausencia de una secuencia de ADN dada por la reacción en cadena de la polimerasa, presencia o ausencia de una auxotrofia, presencia o ausencia de una enzima, presencia o ausencia de una actividad enzimática tal como la actividad de la piruvato formato liasa o la actividad de la lactato deshidrogenasa, hibridación de ácidos nucleicos de colonias, detección de anticuerpos, etc. Los términos "Campbell entrante" y "Campbell saliente" también se pueden usar como verbos en diversos tiempos para referirse al procedimiento o procedimiento descrito anteriormente.

Se entiende que el evento de recombinación homóloga que conduce a un "Campbell entrante" o "Campbell saliente" puede ocurrir en un intervalo de bases de ADN dentro de la secuencia de ADN homóloga, y dado que las secuencias homólogas serán idénticas entre sí por al menos parte de este intervalo, generalmente no es posible especificar exactamente dónde ocurrió el evento del punto de cruce. En otras palabras, no es posible especificar con precisión cuál secuencia fue originalmente del ADN insertado y cuál fue originalmente del ADN cromosómico. Además, la primera secuencia de ADN homóloga y la segunda secuencia de ADN homóloga generalmente están separadas por una región de no homología parcial, y es esta región de no homología que permanece depositada en un cromosoma de la célula "Campbell saliente".

Preferiblemente, la primera y la segunda secuencia homóloga de ADN tienen al menos aproximadamente 200 pares de bases de longitud, y pueden tener hasta varios miles de pares de bases de longitud. Sin embargo, el procedimiento puede hacerse trabajar con secuencias más cortas o más largas. Por ejemplo, una longitud para la primera y la segunda secuencia homóloga puede variar de aproximadamente 500 a 2.000 bases, y la obtención de un "Campbell saliente" a partir de un "Campbell entrante" se facilita al organizar la primera y la segunda secuencia homóloga para que sean aproximadamente la misma longitud, preferiblemente con una diferencia de menos de 200 pares de bases y más preferiblemente, siendo el más corto de los dos al menos el 70 % de la longitud del más largo en pares de bases.

Al aplicar el procedimiento anterior de modificación genética, se prepararon cepas mutantes de una cepa productora de SA particular (es decir, DD1) eliminando los genes de la enzima piruvato formato liasa endógena y/o la enzima de lactato deshidrogenasa como se describe con más detalle en los siguientes ejemplos.

d2) Etapas de fermentación:

Una fermentación como se usa de acuerdo con la presente invención se puede realizar, por ejemplo, en fermentadores agitados, columnas de burbujas y reactores de bucle. En "Chmiel: Bioprozesstechnik: Einführung in die Bioverfahrenstechnik, Band 1" se puede encontrar una descripción general de los posibles tipos de procedimientos, incluidos tipos de agitadores y diseños geométricos. En el procedimiento de la invención, las variantes típicas disponibles son las siguientes variantes conocidas por las personas experimentadas en la técnica o explicadas, por ejemplo, en "Chmiel, Hammes and Bailey: Biochemical Engineering", como por ejemplo lote, alimentado por lotes, alimentación repetida por lote o bien fermentación continua con y sin reciclaje de la biomasa. Dependiendo de la cepa de producción, se puede efectuar salpicado con aire, oxígeno, dióxido de carbono, hidrógeno, nitrógeno o mezclas de gases apropiados para lograr un buen rendimiento (YP/S).

Antes de que la conversión química prevista en un caldo de fermentación se realice en el procedimiento de acuerdo con la invención, el caldo de fermentación puede pretratarse; por ejemplo, la biomasa del caldo se puede eliminar. Los procedimientos para eliminar la biomasa son conocidos por las personas experimentadas en la técnica, por ejemplo, filtración, sedimentación y flotación. En consecuencia, la biomasa se puede eliminar, por ejemplo, con centrífugas, separadores, decantadores, filtros o en aparatos de flotación. Para la máxima recuperación del producto de valor, el lavado de la biomasa suele ser recomendable, por ejemplo, en forma de una diafiltración. La selección del procedimiento depende del contenido de biomasa en el caldo del fermentador y de las propiedades de la biomasa y también de la interacción de la biomasa con el producto de valor. En una realización, el caldo de fermentación se puede esterilizar o pasteurizar.

En una realización adicional, el caldo de fermentación se concentra. Dependiendo del requisito, esta concentración se puede hacer por lotes o de manera continua. El intervalo de presión y temperatura debe seleccionarse de modo que, en primer lugar, no se produzcan daños al producto y en segundo lugar, se requiera un uso mínimo del aparato y energía. La selección hábil de los niveles de presión y temperatura para una evaporación multietapa en particular permite el ahorro de energía.

Se pueden utilizar tanques de agitación, evaporadores de película descendente, evaporadores de película delgada, evaporadores de circulación forzada y otros tipos de evaporadores en modo de circulación natural o forzada.

d3) Esterificación de SA e hidrogenación

5 Las condiciones experimentales adecuadas para realizar la esterificación química, seguidas de la hidrogenación catalítica directa son bien conocidas y por ejemplo, se describen en la Solicitud de Patente Europea 06007118.0.

a) procedimiento de esterificación:

El procedimiento de esterificación, que puede comprender una destilación reactiva, se puede realizar utilizando un aparato conocido per se en diversos diseños.

10 Por ejemplo, se puede usar una planta de esterificación, que funciona en modo continuo, que comprende una columna de rectificación con un número apropiado de etapas teóricas logradas mediante la instalación de bandejas o empaques. La carga acuosa que comprende la sal de amonio de SA se alimenta en la parte superior de la columna desde un recipiente de reserva tan pronto como se forma un perfil de temperatura en estado estable en la columna como resultado de la alimentación del alcohol que se evapora en el bucle del evaporador adherido al sumidero de la columna. La reacción forma un flujo a contracorriente de líquido y condensado descendente, que
15 contiene sal de amonio, y una fase de vapor ascendente, que contiene alcohol. Para catalizar la reacción de esterificación, se puede agregar un catalizador homogéneo a la carga inicial de la sal de amonio. Alternativamente, pueden proporcionarse catalizadores heterogéneos en las columnas internas. El éster carboxílico formado es líquido bajo las condiciones del procedimiento y pasa a través del extremo inferior de la columna al sumidero de la columna de destilación y se retira continuamente del sumidero. Los componentes gaseosos, por ejemplo, mezclas
20 azeotrópicas que comprenden alcohol, agua y/o amoníaco, se eliminan de la columna de reacción y por lo tanto, del equilibrio de reacción en la parte superior de la columna.

Se pueden implementar modificaciones adicionales de las realizaciones específicas descritas anteriormente sin esfuerzo inaceptable por la persona experimentada en la técnica.

25 Los intervalos de parámetros de procedimiento adecuados para el procedimiento de esterificación de acuerdo con la invención pueden ser determinados fácilmente por la persona experimentada en la técnica dependiendo de la configuración del aparato utilizado, por ejemplo, el tipo de internos de columna utilizados, el tipo y cantidad de los reactivos, el tipo y cantidad del catalizador utilizado, si procede. Por ejemplo, sin ser restrictivo al mismo, los parámetros individuales se pueden establecer dentro de los siguientes intervalos de parámetros:

Temperatura de la columna: 0-300 °C, en particular 40-250 °C, o 70-200 °C

30 Presión: desde 0,1 a 6 bar, en particular presión estándar.

Tiempo de residencia: unos pocos segundos (por ejemplo, desde 1 a 60) hasta días (por ejemplo, desde 1 a 5), en particular desde unos pocos minutos (por ejemplo, desde 1 a 60) hasta unas pocas horas (por ejemplo, desde 1 a 15), más preferiblemente desde unos pocos minutos (por ejemplo, desde 5 a 20) hasta 2 horas.

b) Procedimiento de hidrogenación

35 Los ésteres de SA o SA preparados de acuerdo con la invención per se, se hidrogenan de una manera conocida per se utilizando procedimientos, aparatos y asistentes, tales como catalizadores, familiares para la persona experimentada en la técnica.

40 En particular, se lleva a cabo una hidrogenación en fase gaseosa continua o por lotes en presencia de un catalizador heterogéneo adecuado para la hidrogenación del éster. La persona experimentada en la técnica puede establecer los parámetros óptimos del procedimiento para el éster particular sin esfuerzo inaceptable. Por ejemplo, la temperatura de reacción está en el intervalo de aproximadamente 100 a aproximadamente 300 °C, de manera preferible en el intervalo de aproximadamente 200 a 280 °C, y la presión es de aproximadamente 5 a 100 bar, por ejemplo, de 10 a 50 bar. La proporción molar de reactivo a hidrógeno se establece dentro del intervalo de aproximadamente 1:100 a aproximadamente 1:2.000, por ejemplo, de 1:800 a 1:1.500.

45 Los catalizadores utilizables para la reacción de hidrogenación son conocidos por las personas experimentadas en la técnica. Por ejemplo, se pueden usar diversos catalizadores de cobre. La técnica anterior describe, por ejemplo, el uso de catalizadores de cromita de cobre reducidos que se pueden obtener 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 con soporte, aplicándose el óxido de cobre a materiales de soporte de alúmina o sílice. Los ejemplos de la hidrogenación de ésteres succínicos en BDO (1,4-butanodiol)/GBL (gamma-butirlactona)/THF con catalizadores de cobre también se describen en la siguiente tesis: Schlander, enero, febrero
50 de 2000, Universidad de Karls-ruhe, "Gasphasenhydrierung von Maleinsäuredimethylester zu 1,4-Butandiol, gamma-Butyrolacton und Tetrahydrofuran an Kupfer-Katalysatoren".

La presente invención se describirá con mayor detalle por medio de los siguientes ejemplos. Los siguientes ejemplos tienen fines ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la invención.

Ejemplos: modificación genética y cultivación

Ejemplo 1: Procedimiento general para la transformación de DD1

5 Tabla 1: Nomenclatura del DD1 tipo salvaje y mutantes mencionados en los ejemplos.

Cepa	Descripción
LU13843	DD1 tipo salvaje (depósito DSM18541)
LU15348	DD1 Δ <i>pfl</i>
LU15050	DD1 Δ <i>ldh</i>
LU15224	DD1 Δ <i>pfl</i> Δ <i>ldh</i>

La cepa de *Pasteurella* LU13843 (DD1 de tipo salvaje) se transformó con ADN mediante electroporación utilizando el siguiente protocolo:

10 Para preparar un precultivo, se inoculó LU 13843 de una placa de Agar BHI recién cultivada en 40 ml de BHI (infusión de cerebro y corazón, Difco) en un matraz de agitación de 100 ml. La incubación se realizó durante la noche a 30 °C; 200 rpm.

15 Para preparar el cultivo principal, se colocaron 50 ml de BHI en un matraz de agitación de 100 ml y se inocularon en una OD final (610 nm) de 0,4 con el precultivo. La incubación se realizó durante aproximadamente 1,5 horas a 30 °C, 200 rpm. Las células se cosecharon a una OD de aproximadamente 1,3, las pellas se lavaron una vez con glicerol frío al 10 % a 4 °C y se resuspendieron en 1,7 ml de glicerol al 10 % (4 °C).

Se mezclaron 100 μ l de células competentes con 5-10 μ g de ADN (10-20 μ l) y se mantuvieron en hielo durante 2 minutos en una cubeta de electroporación con un ancho de 0,2 cm. Electroporación bajo las siguientes condiciones: 800 Ω ; 25 μ F; 2 kV (Gene Pulser, Bio-Rad). Se añadió 1 ml de BHI inmediatamente después de la electroporación y se realizó una incubación durante 2 horas a 30 °C.

20 Las células se sembraron sobre placas con BHI con 5 mg/l de cloranfenicol y se incubaron durante 2-5 días a 30 °C hasta que las colonias de los transformantes eran visibles. Los clones se aislaron y se resembró en línea en BHI con 5 mg/l de cloranfenicol hasta que se obtuvo la pureza de los clones.

Ejemplo 2: Generación de estructuras de eliminación

25 Los plásmidos de mutación/eliminación se construyeron en base al vector pSacB (SEQ ID NO:3). La Figura 1 muestra un mapa esquemático del plásmido pSacB. Las regiones flanqueantes 5' y 3' del fragmento cromosómico, que deberían eliminarse, se amplificaron mediante PCR a partir de ADN cromosómico de LU 13843 y se introdujeron en dicho vector utilizando técnicas estándar. Normalmente, al menos el 80 % de los ORF fueron el objetivo de una eliminación. De esta manera, se construyeron los plásmidos de eliminación para la piruvato formato liasa *pfl*, pSacB (Δ *pfl*) (SEQ ID NO:4) y la lactato deshidrogenasa *ldhA*, pSacB (Δ *ldhA*) (SEQ ID NO:5). Las Figuras 2 y 3 muestran mapas esquemáticos del plásmido pSacB (Δ *pfl*) y pSacB (Δ *ldhA*).

30 En la secuencia plasmídica de pSacB (SEQ ID NO:3) el gen *sacB* está constituido por las bases 5169-6590. El gen del cloranfenicol está constituido por las bases 526-984. El promotor *sacB* está constituido por las bases 3802-4264. El gen del cloranfenicol está constituido por las bases 526-984. El origen de replicación para *E.coli* (*ori EC*) está constituido por las bases 1477-2337.

35 En la secuencia plasmídica de pSacB delta *pfl* (SEQ ID NO:4), la región flanqueante 3' del gen *pfl*, que es homóloga al genoma de DD1, está constituido por las bases 65-1533, mientras que la región flanqueante 5' del gen *pfl* que es homólogo al genoma de DD1 está constituido por las bases 1534-2956. El gen *sacB* está constituido por las bases 5256-6677. El promotor *sacB* está constituido por las bases 6678-7140. El gen del cloranfenicol está constituido por las bases 3402-3860. El origen de replicación para *E.coli* (*ori EC*) está constituido por las bases 4353-5213.

40 En el plásmido pSacB delta *ldh* (SEQ ID NO:5), la región flanqueante 5' del gen *ldh*, que es homóloga al genoma de DD1, está constituido por las bases 2850-1519, mientras que la región flanqueante 3' del gen *ldh*, que es homóloga al genoma de DD1, está constituido por las bases 1518-63. El gen *sacB* está constituido por las bases 5169-6590. El promotor *sacB* está constituido por las bases 6591-7053. El gen del cloranfenicol está constituido por las bases 3315-3773. El origen de replicación para *E. coli* (*ori EC*) está constituido por las bases 4266-5126.

45 **Ejemplo 3: Generación de cepas productoras de succinato mejoradas**

a) La LU 13843 se transformó como se describió anteriormente con el pSacB (Δ pfl) y fue "entrante según Campbell" para producir una cepa "Campbell entrante". La transformación y la integración en el genoma de LU 13843 se confirmaron mediante PCR, produciendo bandas para el evento de integración del plásmido en el genoma de LU 13843.

5 La cepa "Campbell entrante" fue luego "saliente según Campbell" utilizando placas de agar que contenían sacarosa como un medio de contra selección, seleccionando para la pérdida (de función) del gen sacB. Por lo tanto, las cepas "Campbell entrante" se incubaron en 25-35 ml de medio no selectivo (BHI que no contiene antibióticos) a 37 °C, 220 rpm durante la noche. El cultivo durante la noche fue luego sembrado en línea sobre placas de sacarosa que contenían BHI recién preparadas (10 %, sin antibióticos) y se incubó durante la noche a 37 °C ("primera transferencia de sacarosa"). Las colonias individuales obtenidas de la primera transferencia se sembraron en línea nuevamente sobre placas de sacarosa que contenían BHI recién preparadas (10 %) y se incubaron durante la noche a 37 °C ("segunda transferencia de sacarosa"). Este procedimiento se repitió hasta que se completaron como mínimo cinco transferencias ("tercera, cuarta, quinta transferencia de sacarosa") en sacarosa. El término "primera a quinta transferencia de sacarosa" se refiere a la transferencia de una cepa después de la integración cromosómica de un vector que contiene un gen sacB levansucrase en sacarosa y un medio de crecimiento que contiene placas de agar con el fin de seleccionar cepas con la pérdida del gen sacB y las secuencias de plásmidos circundantes. Una sola colonia de las quintas placas de transferencia se inoculó en 25-35 ml de medio no selectivo (BHI que no contenía antibióticos) y se incubó a 37 °C, 220 rpm durante la noche. El cultivo de la noche se diluyó en serie y se sembró sobre placas de BHI para obtener colonias individuales aisladas.

Las cepas "entrante según Campbell" que contienen la mutación/eliminación del gen pfl fueron confirmadas por la sensibilidad al cloranfenicol. Los mutantes de mutación/eliminación entre estas cepas se identificaron y confirmaron mediante análisis de PCR. Esto condujo al mutante DD1 delta pfl LU 15348 de mutación/eliminación pfl.

25 b) LU15348 se transformó con pSacB (Δ Idh) como se describió anteriormente y fue "entrante según Campbell" para producir una cepa "Campbell entrante". La transformación e integración se confirmó mediante PCR. La cepa "Campbell entrante" fue luego "saliente según Campbell" como se describió anteriormente. Los mutantes de eliminación entre estas cepas se identificaron y confirmaron mediante análisis de PCR. Esto condujo al mutante de eliminación doble LU15224 de pfl *ldhA*.

30 c) LU13843 se transformó con pSacB (Δ Idh) como se describió anteriormente y fue "entrante según Campbell" para producir una cepa "Campbell entrante". La transformación e integración se confirmó mediante PCR. La cepa "Campbell entrante" fue luego "saliente según Campbell" como se describió anteriormente. Los mutantes de eliminación entre estas cepas se identificaron y confirmaron mediante análisis de PCR. Esto condujo al mutante de eliminación LU15050 de *ldhA*.

35 Ejemplo 4: preparación de banco celular

1. preparación de medios

La composición de los medios de cultivo se describe en la tabla 2.

Tabla 2: Composición de medios sólidos y líquidos para la preparación de bancos celulares.

Compuesto	Concentración [g/l]	Concentración de solución madre [g/l]
Glucosa	varía ^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	Varía ^b	-
Agar Bacto (solo para medio solido)	12	

^aConcentraciones de glucosa fueron 15 g/l (en placas) y 20 o 50 g/l (en medio líquido).

^bMgCO₃ (Riedel-de Haen, número de producto: 13117 por Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH) concentraciones fueron 5 g/l (en placas) y 0 o 30 g/l (en medio líquido).

5 g de extracto de levadura, 5 g de peptona, MgCO₃ y (para medios sólidos) 12 g de agar Bacto se mezclaron en 900 ml de agua destilada y se esterilizó en autoclave (20 minutos). Después de enfriar a aproximadamente 65 °C, los componentes faltantes se agregaron como soluciones madre estériles. La glucosa, sulfato de amonio y K₂HPO₄ fueron todos esterilizados en autoclave por separado. Los cloruros de Ca-, Mg-y Na se esterilizaron en autoclave juntos.

2. Preparación de MCB

El banco celular maestro (MCB) para la inoculación de los experimentos individuales se realizó como se indica a continuación. Dos placas de agar fueron recién inoculadas con la cepa deseada y se incubaron a 37 °C en una jarra anaerobia (Anaerocult A, Merck) durante la noche. La biomasa se retiró de las placas y se resuspendió en un medio líquido libre de MgCO₃ con 20 g/l de glucosa para ajustar OD₆₀₀≈1,0. La inoculación se realizó con 0,5 ml de esta suspensión celular. Los cultivos se realizaron en botellas de 100 ml de suero con tapones de goma de butilo herméticos (Ochs GmbH, Bovenden/lenglern, 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 sobrepresión de 0,8 bar. Las botellas 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 una botella y se realizó el muestreo y el análisis de HPLC después de 0, 3, 4, 5, 7, 8 y 8,5 horas. Después de 8,5 horas (la concentración de glucosa fue de 3,4 g/l) se detuvo el cultivo. Se llenaron alícuotas de 0,5 ml de suspensión celular y 0,5 ml de glicerol estéril en crioviales, se mezclaron y se almacenaron durante 13 horas a -20 °C y luego a -80 °C como MCB. El MCB se probó para determinar su pureza sembrando en línea un bucle del último criovial en placas de agar como control de contaminación y verificar en cultivo líquido (medios como se describen en la tabla 8) el espectro del producto y la contaminación (mediante microscopía).

El consumo de glucosa y la formación de SA y subproductos se cuantificaron mediante análisis de HPLC de los sobrenadantes sin diluir, libres de células del caldo de cultivo utilizando detección RI. Las muestras de caldo se tomaron con una jeringa estéril a través del tapón de goma de butilo, la separación celular se realizó por filtración (0,22 µm). Se utilizaron una columna I. D. Aminex HPX-87 H (Biorad) de 300 x 7,8 mm y 5 mm de H₂SO₄, como fase estacionaria y móvil, respectivamente. La temperatura de la columna fue de 30 °C, la rata de flujo fue de 0,5 ml min⁻¹.

Se utilizó un vial de MCB para inocular una botella de 100 ml de suero con un tapón de goma de butilo hermético (ver arriba) que contiene 50 ml del medio líquido con 50 g/l de glucosa. La incubación se realizó durante 10 horas a 37 °C en una incubadora de agitación (velocidad de rotación: 180 rpm, diámetro de agitación: 2,5 cm). Al final del cultivo, la concentración de glucosa fue de 20 g/l y el pH alrededor de 6,5. Las alícuotas de 0,5 ml de suspensión celular y 0,5 ml de glicerol estéril se rellenaron en crioviales, se mezclaron y se almacenaron a -80 °C como WCB. Los controles de pureza fueron los mismos que para el MCB. Las condiciones de HPLC fueron las mismas que las descritas anteriormente.

Ejemplo 5: Cultivo de diversas cepas de DD1 en glicerol o glicerol y maltosa

La productividad de la cepa mutante DD1Δ pfl (LU15348) y DD1Δ pfl Δ ldh (LU15224) en presencia de glicerol o glicerol y maltosa como fuente de carbono se analizó adicionalmente utilizando el siguiente medio y condiciones de incubación.

1. Preparación del medio

La composición y preparación del medio de cultivo es como se describe en la tabla 3 a continuación.

Tabla 3: Composición del medio para el cultivo de DD1 en los sustratos glicerol o glicerol y maltosa.

Compuesto	Concentración [g/l]
1 Extracto de levadura Bacto (Becton Dickinson)	10
2 (NH ₄) ₂ SO ₄	2
3 CaCl ₂ *2H ₂ O	0,2
4 MgCl ₂ *6H ₂ O	0,2

(continuación)

	Compuesto	Concentración [g/l]
5	NaCl	1
6	K ₂ HPO ₄	3
7	MgCO ₃ (Riedel-de Haen 13117)	1g/g sustrato
9	NaHCO ₃	8,4
10	sustrato	varía

Medio de crecimiento sintético alternativo

- 5 Es favorable utilizar un medio de crecimiento sintético sin ingredientes complejos para la fermentación con el fin de mejorar el procesamiento posterior y diseñar un medio de crecimiento sintético para una fermentación rentable.

Preparación del medio

- 10 El medio de crecimiento sintético se desarrolló en relación con otros medios de crecimiento sintéticos para las bacterias del rumen (Nili y Brooker, 1995, McKinlay et al, 2005), experiencia previa con otras bacterias y mediante la realización de experimentos de omisión única. Finalmente, el medio contenía 50 g/l de glucosa, 1 g/l (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 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/o 0,1 g/l de glutamina.

- 15 Las botellas de suero que contenían 50 ml de medio de crecimiento sintético se esterilizaron en autoclave con agua y 30 g/l de MgCO₃ como sistema regulador. Se esterilizaron por separado glucosa, sulfato de amonio y fosfato de potasio. Se esterilizaron juntos los cloruros de Ca-, Mg- y Na. Las vitaminas y aminoácidos se ensamblaron en diversas soluciones madre y se esterilizaron por filtración. Después de enfriar las botellas de suero, los componentes se añadieron como soluciones madre estériles.

2. Cultivos y análisis

- 25 Para cultivar el cultivo de semilla, se usó un vial de WCB para inocular una botella de 100 ml de suero con un tapón de goma de butilo hermético (ver arriba) que contiene 50 ml del medio líquido descrito en la tabla 2 pero con 20 g/l de glucosa y una atmósfera de CO₂ con sobrepresión de 0,8 bar. La incubación se realizó durante un número de horas específico para mutantes (tabla 4) a 37 °C y 160 rpm (diámetro de agitación: 2,5 cm). La suspensión celular se centrifugó (Biofuge primo R, Heraeus) con 5.000 g durante 5 minutos y la pella celular se lavó y luego se resuspendió en 50 ml de medio sin una fuente de carbono y sin MgCO₃ para generar un inóculo libre de glucosa (todos las etapas a temperatura ambiente y en la cámara anaerobia).

- 30 Tabla 4: Tiempo de incubación de diversos cultivos de semillas mutantes DD1

Cepa	Horas de incubación
LU 13843	8 horas
LU 15050	10 horas
LU 15348	13 horas
LU 15228	20 horas

- 35 Los cultivos principales se cultivaron en botellas de 100 ml de suero que contenían 10 ml de medio líquido con 50 g/l de glicerol o 50 g/l de glicerol y 10 g/l de D-maltosa y en ambos casos una atmósfera de CO₂ con sobrepresión de 0,8 bar. La calidad de 'Glicerol 99 %, puriss.' (Riedel-de Haen, número de producto: 15523-1L-R de Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze, Alemania) se utilizó para todos los experimentos. La inoculación se realizó con 1,5 ml del inóculo libre de glucosa. Las botellas se incubaron a 37 °C y 160 rpm (diámetro de agitación: 2,5 cm).

El consumo de las fuentes C y la producción de ácidos carboxílicos se cuantificó mediante HPLC como se describe en el ejemplo 4 después de 24 horas. Al medir el glicerol, la temperatura de la columna se ajustó a 50 °C para lograr una separación suficiente de SA, ácido láctico y glicerol que tienen tiempos de retención similares.

5 El crecimiento celular se midió midiendo la absorbancia a 660 nm (OD₆₀₀) utilizando un espectrofotómetro (Ultrospec3000, Amersham Biosciences, Uppsala Suecia). La concentración celular definida como gramo de peso de células secas (DCW) por litro se calculó a partir de la curva estándar predeterminada que relaciona el OD₆₀₀ con el DCW (1 OD₆₀₀ = 0,27 g DCW l⁻¹).

3. Resultados

10 Los resultados de los experimentos de cultivo con diferentes cepas DD1 se muestran en la tabla 5 para el sustrato de glicerol y la tabla 6 para la mezcla de sustrato de glicerol y maltosa.

Tabla 5: Cultivo de diversas cepas DD1 en glicerol

cepa DD1	LU13843	LU15348	LU15050	LU15224
tc [h] ^a	24	24	24	24
ΔC _{Glicerol} [g/l] ^b	-17,3	-25,8	-17,4	-28,6
ΔC _{SA} [g/l] ^c	19,5	29,9	19,9	36,2
ΔC _{LA} [g/l] ^{c, h}	<0,01	<0,01	<0,01	0,04
ΔC _{FA} [g/l] ^{c, h}	0,2	0,05	0,2	<0,01
ΔC _{AA} [g/l] ^{c, h}	1,0	0,6	1,1	0,3
ΔC _{PA} [g/l] ^{c, h}	0,3	<0,01	0,4	<0,01
ΔC _{MA} [g/l] ^{c, h}	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Sum de productos secundarios SSP [g/l] ^d	1,5	0,7	1,7	0,3
SA/SSP [g/g] ^e	13,0	46,0	11,7	>100
Proporción SA/FA ^f	97,5	>100	99,5	>100
Proporción SA/AA ^f	19,5	49,8	18,1	>100
STY [g/(l h)] ^g	0,81	1,24	0,82	1,50
Rendimiento de carbono (YP/S) [g/g] ^g	1,12	1,15	1,13	1,26
^a tiempo de cultivo. ^b consumo de sustrato (glicerol, maltosa). ^c formación de ácido succínico, láctico, fórmico, acético, pirúvico y málico. ^d suma de productos secundarios de ácido láctico, fórmico, acético, pirúvico y málico. ^e proporción de SA por suma de productos secundarios. ^f proporción de SA por producto secundario (FA = ácido fórmico; AA = ácido acético). ^g rendimiento espacio tiempo y rendimiento (YP/S) para SA. ^h se encontró que los límites de detección para ácido acético, ácido láctico, ácido málico, y ácido fórmico eran inferiores a 0,01 g/l en el procedimiento HPLC dado				

15 En el experimento de cultivo con glicerol se muestra que anular el gen *pfl* de la piruvato formato liasa en un organismo productor de SA como por ejemplo, DD1 conduce a un rendimiento de carbono significativamente mayor (YP/S) y STY para SA como para el tipo salvaje cuando se cultiva en glicerol como sustrato. El rendimiento de carbono (YP/S) se incrementó de 1,12 g/g para la cepa DD1 a 1,15 g/g para la cepa LU15348 mutante de Δ *pfl*.

20 Aparte de lo reportado por Lee et al, 2006 o Lin et al 2005 para las bacterias productoras de SA en glucosa, anular solo el gen *ldhA* de la lactato deshidrogenasa en DD1 (LU15050) no muestra mejoría de las características técnicas relevantes de esta fermentación tal como STY de SA y sólo un pequeño aumento en el rendimiento de carbono (YP/S). Sin embargo, la cantidad de ácido acético aumenta incluso si la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa disminuye. De manera sorprendente e inesperada, a partir del análisis del comportamiento de las cepas con las mutaciones únicas, se encontró que la cepa mutante que porta la combinación de las mutaciones genéticas en el gen *pfl* y el gen *ldh*, la fermentación del glicerol en SA muestra una mejora aún mayor no aditiva del

rendimiento de carbono alcanzado (YP/S) como se esperaba de las mutaciones únicas de LU 15050 y LU15348. El rendimiento de carbono (YP/S) de 1,26 g/g observado es cercano al rendimiento de carbono teórico potencial (YP/S) de 1,28 g/g para la conversión de glicerol 1 Mol + CO₂ 1 Mol en SA 1 Mol.

- 5 También, la suma de productos secundarios (SSP) generados en LU15348 se reduce significativamente mientras crece en glicerol ya que no se produce ácido fórmico y se produce menos ácido acético. Como se mencionó anteriormente, la concentración de SA aumenta significativamente en comparación con el tipo salvaje o LU15050.

Esta observación se expresa en las proporciones de SA sobre la suma aritmética de productos secundarios (SSP) SA:SSP g/g, que excede de 40 para LU15348 y excede de 100 para LU15224 comparado con un nivel de 10 para LU13843 y LU15050.

- 10 En el experimento mencionado anteriormente, se encontró que el STY de la fermentación de glicerol en SA no superaba los 1,5 g/(l*h) para las cepas que portan mutaciones en los genes pfl y ldh. Por lo tanto, se desarrolló un procedimiento mejorado que mostró valores de STY mejorados para la producción de SA en una fermentación anaerobia. Este procedimiento se describe en la solicitud PCT/EP2008/006714 en las páginas 44-46. Este procedimiento se adaptó para la producción de succinato utilizando cepas que portan mutaciones en los genes.

- 15 Tabla 6: Cultivo de diversas cepas DD1 en glicerol y maltosa

	LU13843	LU15348	LU15050	LU15224
tc [h] ^a	24	24	24	24
$\Delta C_{\text{Glicerol}}$ [g/l] ^b	-41,2	-48,2	-40	-51,3
$\Delta C_{\text{Maltosa}}$ [g/l] ^b	-11,5	-10,9	-11,3	-11,3
ΔC_{SA} [g/l] ^c	53,2	64,7	51,8	69,8
ΔC_{LA} [g/l] ^{c, 1}	<0,01	2,5	<0,01	0,1
ΔC_{FA} [g/l] ^{c, 1}	2,8	<0,01	3,0	<0,01
ΔC_{AA} [g/l] ^c	3,8	0,7	3,6	1,5
ΔC_{PA} [g/l] ^{c, 1}	<0,01	0,6	0,1	0,4
ΔC_{MA} [g/l] ^{c, 1}	0,05	0,03	0,03	0,1
Σ SP [g/l] ^d	6,65	3,8	6,73	2,1
SA/SSP [g/g] ^e	8,0	16,9	7,7	33,2
Proporción SA/FA ^f	19,11	>100	17,1	>100
Proporción SA/AA ^f	13,9	92,7	14,2	46,2
STY [g/(l h)] ^g	2,21	2,69	2,15	2,90
Rendimiento (YP/S) [g/g] ^g	1,01	1,09	1,01	1,11
OD ₆₀₀ ^h	12,9	14,8	16,4	18,6
DCW [g/l] ⁱ	3,5	4	4,4	5
Productividad específica [g gDCW ⁻¹ h ⁻¹] ^k	0,63	0,67	0,49	0,58

^a tiempo de cultivo.

^b consumo de sustrato (glicerol, maltosa).

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

^d suma de productos secundarios de ácido láctico, fórmico, acético, pirúvico y málico.

^e proporción de SA por suma de productos secundarios.

^f proporción de SA por producto secundario (FA= ácido fórmico; AA= ácido acético).

^g rendimiento espacio tiempo y rendimiento (YP/S) para SA

^h densidad óptica a 600nm, diluir la muestra 1:20 con HCl 1M antes de medir en una Ultrospec2000, Amersham Biosciences, Uppsala Suecia.

ⁱ g Biomasa como peso celular seco (DCW)

^h Productividad específica: g de SA por g de biomasa (peso celular seco) por h

ⁱ Se encontró que los límites de detección para ácido acético, ácido láctico, ácido málico, y ácido fórmico eran inferiores a 0,01 g/l en el procedimiento HPLC dado

Se ha demostrado que cultivar DD1 en glicerol simultáneamente con otro sacárido como maltosa permite un SA STY y un rendimiento más altos (YP/S) y una concentración aumentada de productos secundarios en comparación con el uso de glicerol como el único sustrato (PCT/EP2008/006714 en la páginas 44-46).

5 La comparación de LU15348 con el DD1 tipo salvaje muestra un aumento en la cantidad de SA, STY y rendimiento de carbono (YP/S) si la actividad de la enzima Pfl disminuye. Sorprendentemente, a diferencia de otros ejemplos descritos en el estado de la técnica (Lee et al 2006, Lin et al 2005), no se observó ningún defecto de crecimiento en las cepas mutantes sobre la cepa DD1 no mutada. Esta observación es de gran relevancia técnica ya que el buen crecimiento de una cepa es esencial para un procedimiento de producción técnico. El crecimiento celular aumenta en todos los mutantes en comparación con el tipo salvaje. La anulación de pfl o ldh tiene un efecto positivo en el crecimiento de la cepa bacteriana mutada.

10 Debido a la falta de ácido fórmico detectable, la disminución de la cantidad de ácido acético y el aumento de la concentración de SA, aumenta la proporción SA/SSP en cepas mutantes que contienen una actividad enzimática disminuida de Pfl deducida por mutaciones genéticas. Sin embargo, el ácido láctico del producto secundario ha aumentado en comparación con el tipo salvaje. El LU15224 de doble anulación tiene un mayor rendimiento adicional (YP/S) y STY mientras que LU15050 no mostró ninguna mejora en el rendimiento de carbono (YP/S), STY o el SSP observado.

15 Se observa que la mutación de pfl es necesaria y suficiente para mejorar la fermentación del glicerol con y sin un segundo sustrato de sacárido sobre el desempeño de una cepa de tipo salvaje en un procedimiento de SA a base de la metabolización del glicerol. En contraste con este hallazgo, una mutación de pfl de la técnica anterior en una cepa derivada de tipo salvaje no se ha demostrado que induzca la fermentación de SA (Zhu 2005). Solo las combinaciones de varias mutaciones, incluyendo pfl y ldh, dieron como resultado una producción medible de ácido succínico, aunque con un crecimiento reducido y un pobre desempeño de STY (Lin 2005, Lee 2006). El descubrimiento de este trabajo enseña la construcción de un procedimiento mejorado para la producción fermentativa de SA que consiste en una cepa mutada junto con un procedimiento específico para producir un procedimiento con un desempeño superior al de la técnica anterior.

20 Sorprendentemente, la productividad específica para SA es superior para la cepa LU15348 mutante pfl sobre LU15050 y LU15224 portadoras de mutaciones en el gen ldh y en ambos genes ldh y pfl. La persona experimentada en el campo sabe que, dependiendo del procedimiento, una alta actividad específica de formación de productos es una característica deseable de un procedimiento técnico. Obviamente, el efecto negativo de anular la lactato deshidrogenasa reduce la productividad específica de LU15348 por debajo del valor del tipo salvaje.

Ejemplo 6: Cultivo de LU15348 en mezclas de glicerol con diversos carbohidratos

La productividad de la cepa mutante LU15348 en presencia de glicerol y diversos carbohidratos como fuente de carbono se analizó utilizando el siguiente medio y condiciones de incubación.

35 1. Preparación del medio, cultivo y analítica

La composición y preparación del medio de cultivo es como se describe en la tabla 3 del ejemplo 5. El cultivo y la analítica ocurren como se describe en el ejemplo 5.

40 Se utilizó 'Maltodextrina' de la calidad (Maldex150, Cat.no.: 50499 por Boom, 7942 JE Meppel, Países Bajos) en este experimento. Debido a la mezcla indefinida de cadenas de sacáridos con diversas longitudes, la concentración de maltodextrina no se analizó en su totalidad por analítica HPLC. Por lo tanto, el contenido de maltodextrina se determinó gravimétricamente justo antes de agregarse al medio de cultivo. Para calcular el límite inferior del rendimiento teórico (YP/S) alcanzado, se asumió que se había consumido toda la maltodextrina agregada a la fermentación, teniendo en cuenta que esto solo permitiría calcular el límite inferior del rendimiento de carbono (YP/S) después de la fermentación de SA. Lo más probable es que los valores más exactos del rendimiento de carbono (YP/S) sean más altos que los valores descritos debido al consumo potencialmente incompleto de la maltodextrina del sustrato de maltodextrina que no se detecta.

2. Resultados

Los resultados de los experimentos de cultivo para LU15348 se muestran en la tabla 7 para el sustrato de glicerol en cofermentación con diversos carbohidratos, como por ejemplo, maltosa, maltodextrina o rafinosa.

50 Tabla 7: Cultivo de LU15348 en glicerol en cofermentación con diversos carbohidratos

LU15348	Glicerol + 10g/l de Maltosa	Glicerol + 10g/l de Maltodextrina	Glicerol + 17g/l de Rafinosa	Glicerol
tc [h] ^a	24	24	24	24
$\Delta C_{\text{Glicerol}}$ [g/l] ^b	-48,2	-30,5	-37,4	-25,8
$\Delta C_{\text{Carbohidrato}}$ [g/l] ^b	-10,9	n.a.	-1,5	---
ΔC_{SA} [g/l] ^c	64,7	48,4	35,6	29,9
ΔC_{LA} [g/l] ^c	2,5	1,0	0,2	<0,01
ΔC_{FA} [g/l] ^{c, i}	<0,01	<0,01	<0,01	0,05
ΔC_{AA} [g/l] ^c	0,7	0,4	0,3	0,6
ΔC_{PA} [g/l] ^{c, i}	0,6	<0,01	0,2	<0,01
ΔC_{MA} [g/l] ^{c, i}	0,03	<0,01	<0,01	<0,01
Σ SP [g/l] ^d	3,8	0,4	0,5	0,7
Proporción SA/SSP [g/g] ^e	16,9	>100	71,2	46,0
Proporción SA/FA ^f	>100	>100	>100	>100
Proporción SA/AA ^f	92,7	>100	>100	49,8
STY [g/(l h)] ^g	2,69	2,02	1,48	1,24
Rendimiento (YP/S) [g/g] ^g	1,09	$\geq 1,02^*$	1,11	1,15

^a tiempo de cultivo.
^b consumo de sustrato (glicerol, maltosa).
^c formación de ácido succínico, láctico, fórmico, acético, pirúvico y málico.
^d suma de productos secundarios de ácido láctico, fórmico, acético, pirúvico y málico.
^e proporción de SA por suma de productos secundarios.
^f proporción de SA por producto secundario (FA= ácido fórmico; AA= ácido acético).
^g rendimiento espacio tiempo y rendimiento (YP/S) para SA
ⁱ Se encontró que los límites de detección para ácido acético, ácido láctico, ácido málico, y ácido fórmico eran inferiores a 0,01 g/l en el procedimiento HPLC dado
* limite inferior del rendimiento (YP/S) debido a la concentración desconcida de maltodextrina residual que no se analizó.

- 5 El cultivo de la cepa LU15348 en glicerol en cofermentación con diversos sacáridos como maltosa, una mezcla de sacáridos de alto peso molecular como maltodextrina o aún otro sacárido, rafinosa, conduce a resultados similares que muestran que la fermentación simultánea de diversas fuentes de carbono, incluido el glicerol, como una fuente de carbono, conduce a una serie de mejoras técnicamente relevantes de la producción de SA sobre el estado de la técnica descrito anteriormente. Los ejemplos son ratas aumentadas y cantidades totales mejoradas de glicerol consumido por el procedimiento, lo que lleva a títulos de SA más altos en comparación con el estado de la técnica. Adicionalmente, el STY se incrementa sobre el control que no contiene un sacárido. La concentración del producto secundario generalmente disminuye, excepto en el caso de la maltosa como cosustrato, donde el ácido láctico es el producto secundario incrementado en comparación con el cultivo con solo glicerol. El rendimiento de SA (YP/S) es similar o solo ligeramente reducido en comparación con glicerol como único sustrato.
- 10

Sumario de los experimentos

- los microorganismos que tienen una actividad de pfl disminuida muestran una fermentación mejorada en glicerol sobre el estado de la técnica
- 15 -combinaciones de diferentes fuentes de carbono se convierten eficientemente en ácido succínico
- los microorganismos que tienen una actividad de pfl disminuida muestran una fermentación mejorada en una mezcla de glicerol y un sacárido sobre el estado de la técnica

Conclusión: El nuevo procedimiento para la producción de ácido succínico (SA) tiene un excelente potencial para la producción de SA y /o sales de SA, con alto rendimiento de carbono (YP/S) y rendimiento espacio tiempo, así como productos secundarios muy bajos.

5 En el contexto de la presente invención, se depositó una cepa bacteriana DD1 (ID 06-614) con DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Alemania) el 11 de agosto de 2006 con el número de depósito DSM 18541. En este contexto, se hace referencia a la solicitud de patente europea de prioridad No. EP 09152959.4 y EP 09171250.5, en el que el depósito se mencionó por primera vez dentro del contexto de la presente invención. Además, se hace referencia al documento WO 2009/024294, en el que la cepa DD1 se describe la primera vez, incluyendo el depósito con DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Alemania) el 11 de agosto de 2006.

Ejemplos: Procesamiento corriente abajo

Ejemplo 7: Procedimiento para el aislamiento de ácido succínico a partir de caldos de fermentación por resina de intercambio iónico catiónico

15 Se filtró un caldo de fermentación neutralizado por NH_4OH (25 % en peso, calculado sobre el peso total de la solución de NH_4OH) durante el procedimiento de fermentación. Se usó el caldo de fermentación acuoso, libre de células, que contenía ácido succínico al 15 % (p/p) (neutralizado como sal) para el procedimiento corriente abajo.

20 Se llenó una resina de intercambio catiónico (tipo Lewatit Monoplus SP 112 de Lanxess; 471 ml) en una columna de vidrio de temperatura controlada (50 °C) (elevación del lecho: 24 cm) como fase estacionaria y se lavó con agua. Después de esta etapa de lavado, la resina se desbordó de forma descendente con la solución acuosa de ácido succínico (156 ml, que contenía 25 g de ácido succínico, densidad: 1,069 kg/l).

El promedio de la velocidad de flujo de la solución fue 33 ml/min correspondiente a una velocidad de 4,2 volúmenes de lecho (BV) por hora.

25 Por lo tanto, en la primera fracción se obtuvo una solución clara e incolora que contenía aproximadamente 24,9 g de ácido succínico libre (453 ml). El promedio de la concentración de ácido succínico de esta fracción fue de 5,38 % en peso.

Se midió además del índice de refracción, el valor de pH y la adsorción (350 nm) de la solución que sale de la columna.

30 El promedio de la capacidad de enlace resultante de la resina intercambiadora catiónica de ácido fuerte usada fue de aproximadamente 0,89 equivalentes (eq) por litro de resina.

Después del procedimiento de enlace, la resina se lavó con agua (546 ml) y finalmente se regeneró en forma catiónica con ácido clorhídrico al 5 % (919 ml; velocidad: 66 ml/min) que rebotó la resina de abajo hacia arriba. Como una última etapa, la resina se lavó nuevamente con agua (889 ml). Además del hecho de que la resina liberó el ácido succínico, la resina decoloró el caldo y se obtuvo una solución de ácido succínico muy pura e incolora.

35 **Ejemplo 8:** Procedimiento para medir una curva de ruptura con una resina de intercambio iónico de ácido fuerte

Se usó caldo de fermentación acuoso, libre de células, que contenía una cantidad de ácido succínico al 15 % (p/p) (neutralizado como sal) para el procedimiento corriente abajo después de la filtración.

40 Una resina de intercambio iónico de ácido fuerte (tipo Lewatit MonoPlus SP 112 de Lanxess; 689 ml) se llenó en una columna de vidrio de temperatura controlada (50 °C) (elevación del lecho: 97,5 cm) y se lavó con agua. Después de esta etapa de lavado, la resina se desbordó de forma descendente con la solución acuosa de ácido succínico (468 ml, que contenía 75 g de ácido succínico; densidad: 1,069 kg/l).

El promedio de la velocidad de flujo de la solución fue 24 ml/min correspondiente a una velocidad de 2,1 volúmenes de lecho (BV) por hora.

45 Como en el ejemplo 7, se obtuvo una solución clara (457 ml) que contenía aproximadamente 53,8 g de ácido succínico libre en la primera fracción. La concentración de ácido succínico de esta fracción promedió 11,53 % en peso.

A diferencia del ensayo en el ejemplo 7, en este caso, el muestreo de la primera fracción se detuvo en el momento en que los cationes rompieron. Este momento se detectó con el valor de pH medido que aumentó repentinamente (desde un valor aproximado de 1,4) debido a la sal de ácido succínico que rompió.

50 La fracción muestreada después de esta solución clara contenía sal de ácido succínico y tenía un color marrón similar al del caldo de fermentación original.

ES 2 715 930 T3

En este ensayo, el promedio de la capacidad de enlace resultante de la resina intercambiadora catiónica de ácido fuerte usada fue de aproximadamente 1,32 equivalentes (eq) por litro de resina.

5 Después del procedimiento de enlace, la resina se lavó con agua (678 ml) y se regeneró en forma catiónica con ácido clorhídrico al 5 % (2034 ml; velocidad: 92 ml/min). Finalmente, la resina se lavó nuevamente con agua (824 ml).

Además del hecho de que la resina liberó el ácido succínico, la resina decoloró el caldo y se obtuvo una solución de ácido succínico muy pura e incolora.

Ejemplo 9: Procedimiento para purificar ácido succínico a partir de caldos de fermentación seguido de concentración y cristalización de la solución desalada resultante

10 Se usaron dos muestras para la etapa de cristalización y se obtuvieron de la misma manera que se describe en el ejemplo 7. En cada caso, se utilizó un caldo de fermentación sin células, acuoso, que contenía una cantidad de ácido succínico al 15 % (p/p) (neutralizado como sal) para el procedimiento corriente abajo. Las dos muestras que se purificaron y desalaron utilizando una resina de intercambio catiónico (tipo Lewatit MonoPlus SP 112 de Lanxess) se utilizaron para la etapa de cristalización.

15 Las siguientes tablas muestran el volumen de caldo de fermentación, resina y productos químicos más las cantidades y capacidades obtenidas en estos ensayos.

Número de ensayo	Caldo de fermentación	resina	Velocidad de dosificación	fracción 1	Concentración del ácido succínico en la fracción 1
34649-069	249 ml	471 ml	33 ml/min	462 ml	8,43 %
34649-098	249 ml	471 ml	53 ml/min	517 ml	7,57 %

Número de ensayo	Ácido succínico en la fracción 1	Agua de lavado después de enlace	HCl (5 %) para regeneración de resina	Agua de lavado después de regeneración	Capacidad de enlazado resultante
34649-069	39,7 g	481 ml	919 ml	928 ml	1,43 eq/l
34649-098	39,9 g	526 ml	919 ml	730 ml	1,44 eq/l

20 Por lo tanto, se obtuvieron dos soluciones claras e incoloras como primeras fracciones y se combinaron para obtener una solución succínica (con aproximadamente 76 g de ácido succínico libre; diferencia debida al muestreo).

Esta solución se concentró por destilación de agua para obtener 380,2 g de solución con una concentración de ácido succínico de 20 % en peso. Después de la etapa de concentración, la solución se agitó y se enfrió. Una vez que la solución tuvo una temperatura de 50 °C, se sembró. Poco después, comenzó la cristalización y se precipitaron cristales de ácido succínico.

25 La suspensión de ácido succínico se agitó durante la noche a temperatura ambiente y se enfrió en un baño de agua helada durante 1 hora.

Los cristales se separaron por filtración en el frío y la torta se lavó dos veces con 20 ml de agua helada cada vez. Después de la etapa de lavado, los cristales se secaron en un flujo de gas de nitrógeno. De este modo, se obtuvieron 65,2 g de cristales de ácido succínico incoloros con una pureza del 99,8 %.

30 Posteriormente, los cristales de ácido succínico se secaron en un secador de lecho fluido.

Referencias

Botstein, D, Shortle, D (1985) Strategies and applications of in vitro mutagenesis. Science 229 1193-201

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.

- Dousse et al. (2008) Routine phenotypic identification of bacterial species of the family *Pasteurellaceae* isolated from animals Dousse, Fjournal of veterinary diagnostic investigation 20 716-724
- Eisenstark, A (1971) Mutagenic and lethal effects of visible and near-ultraviolet light on bacterial cells. Adv Genet 16 167-98
- 5 Hong SH, Lee SY (2001) Metabolic Flux analysis for SA production by recombinant Escherichia coli with amplified malic enzyme activity. Biotechnology and Bioengineering 74/2: 89-95.
- Foster, Patricia L, (2007) Stress-induced mutagenesis in bacteria. Crit Rev Biochem Mol Biol 42 373-97
- Knappe, J, et al. (1993) Pyruvate formate-lyase mechanism involving the protein-based glycy radical. Biochem Soc Trans 21 731-4
- 10 Knappe, J, Sawers, G (1990) A radical-chemical route to acetyl-CoA: the anaerobically induced pyruvate formate-lyase system of Escherichia coli. FEMS Microbiol Rev 6 383-98
- Kuhnert, P. and Christensen, H. 2008 "*Pasteurellaceae*: Biology, Genomics and Molecular Aspects."; ISBN 978-1-904455-34-9.
- 15 Kuhnert P, Scholten E, Haefner S, Mayor D and Frey J (2010), *Basfia succiniciproducens* gen. nov., sp. nov., A new member of the family *Pasteurellaceae* isolated from bovine rumen (2010) International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 60, 44-50.
- Lee PC, Lee SY, Hong SA, Chang HN (2002a) Isolation and characterization of a new SA-producing bacterium, *Mannheimia succiniciproducens* MBEL 55E, from bovine rumen. Appl Microbiol Biotechnol 58: 663-668.
- 20 Lee SJ, Song H, Lee SY (2006) Genome-Based Metabolic engineering of *Mannheimia succiniciproducens* for SA production. Appl Environ Biotechnol 72/3: 1939-1948.
- Leenhouts et al., 1989, Appl Env Microbiol 55, 394-400
- Lin H, San K-Y, Bennett GN (2005) Effect of *Sorghum vulgare* phosphoenolpyruvate carboxylase and *Lactococcus lactis* pyruvate carboxylase coexpression on succinate production in mutant strains of *Escherichia coli*. Appl Microbiol Biotechnol 67: 515-523.
- 25 Pascal, M et al. (1981) Mutants of escherichia-coli-k12 with defects in anaerobic pyruvate metabolism Journal of General Microbiology 124 35-42
- Peters-Wendisch, PG et al. (1996) Archives of Microbiology 165 387-396.
- Peters-Wendisch PG, (1998). Microbiology. 144, 915-27.
- 30 Saier, Milton H Jr (2008) The bacterial chromosome Crit Rev Biochem Mol Biol 43 89-134
- Sambrook et al., (1989) MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. ["Sambrook"].
- Sanchez AM, Bennet GN, San K-Y (2005) Novel pathway engineering design of the anaerobic central metabolic pathway in *Escherichia coli* to increase succinate yield and productivity. Metabolic Engineering 7: 229-239.
- 35 Sawers, G (1993): specific transcriptional requirements for positive regulation of the anaerobically inducible pfl operon by arca and fnr molecular microbiology 10 737-747
- Song H and Lee S (2006) Production of SA by bacterial fermentation. Enz Microb Tech 39: 352- 361.
- 40 Varenne s et al. (1975) Mutant of escherichia-coli deficient in pyruvate formate lyase, molecular & general genetics 141 181-184
- Walker, G C (1984) Mutagenesis and inducible responses to deoxyribonucleic acid damage in *Escherichia coli*. Microbiol Rev 48 60-93
- Walker, G C et al. (1983) Regulation and function of cellular gene products involved in UV and chemical mutagenesis in *E. coli*. Basic Life Sci 23 181-202
- 45 Witkin, E M (1969) Ultraviolet-induced mutation and DNA repair. Annu Rev Microbiol 23 487-514

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

Zhu, et al. (2005) Effect of a single-gene knockout on the metabolic regulation in *Escherichia coli* for D-lactate production under microaerobic condition *Metab Eng* 7 104-15

- 5 Listado de secuencias
- <110> BASF SE
 - <120> Nuevos productores microbianos de ácido succínico y purificación del ácido succínico.
 - <130> PF61823
 - <150> EP 09152959.4
- 10
- <151> 20090216
 - <150> EP 09171250.5
 - <151> 20090924
 - <150> US 61/245306
 - <151> 20090924
- 15
- <160> 5
 - <170> PatentIn versión 3.3
 - <210> 1
 - <211> 1517
 - <212> ADN
- 20
- <213> *Pasteurella* sp.
 - <220>
 - <221> características_misc.
 - <222> (1)..(1517)
 - <223> 16S ADNr
- 25
- <400> 1

ES 2 715 930 T3

tttgatcctg gctcagattg aacgctggcg gcaggettaa 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 cgggccagac tcctacggga ggcagcagtg gggaaatattg 360
 cacaatgggg ggaaccctga tgcagccatg ccgctggaat gaagaaggcc ttcgggttgt 420
 aaagttcttt cggtgacgag gaaggtgttt gttttaatag gacaagcaat tgacgttaat 480
 cacagaagaa gcaccggcta actccgtgcc agcagccgcg gtaatacggga ggggtcgcgac 540
 gttaatcgga ataactgggc gtaaagggca tgcaggcgga cttttaagtg agatgtgaaa 600
 gccccgggct taacctggga attgcatttc agactgggag tctagagtac tttagggagg 660
 ggtagaattc cacgtgtagc ggtgaaatgc gtagagatgt ggaggaatac cgaaggcgaa 720
 ggcagcccct tgggaagata ctgacgetca tatgcgaaag cgtggggagc aaacaggatt 780
 agataccctg gtagtccacg cggtaaacgc tgtcgatttg gggattgggc tttaggcctg 840
 gtgctcgtag ctaacgtgat aaatcgaccg cctggggagt acggccgcaa ggtaaaaact 900
 caaatgaatt gacggggggc cgcacaagcg gtggagcatg tggtttaatt cgatgcaacg 960
 cgaagaacct tacctactct tgacatccag agaatcctgt agagatacgg gagtgccttc 1020
 gggagctctg agacaggtgc tgcattggctg tcgtcagctc gtgttgtgaa atgttgggtt 1080
 aagtcccga acgagcgcaa cccttatect ttgttgccag catgtaaaga tgggaactca 1140
 aaggagactg ccggtgacaa accggaggaa ggtggggatg acgtcaagtc atcatggccc 1200
 ttacgagtag ggctacacac gtgctacaat ggtgcataca gagggcggcg ataccgag 1260
 gtagagcgaa tctcagaaag tgcattcgtg 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

5 <212> ADN

<213> Pasteurella sp.

ES 2 715 930 T3

<220>

<221> características_misc.

<222> (1)..(3008)

<223> 23S ADNr

5 <400> 2

```
agtaataacg aacgacacag gtataagaat acttgagggt gtatgggtaa gtgactaagc      60
gtacaagggt gatgccttgg caatcagagg cgaagaagga cgtgctaate tgcgaaaagc      120
ttgggtgagt tgataagaag cgtctaacce 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
gcacaggggt atagccccgt acttgaaaat cattgtgtgg tactgagctt gcgagaagta      420
gggcgggaca cgagaaatcc tgtttgaaga aggggggacc atcctccaag gctaaatact      480
cctgattgac cgatagttaa ccagtactgt gaaggaaagg cgaaaagaac cccggtgagg      540
ggagtgaaat agaacctgaa acctgtacg tacaagcagt gggagcccgc gagggtgact      600
gcgtaccttt tgtataatgg gtcagcgact tatattatgt agcgagggta accgaatagg      660
```

ES 2 715 930 T3

ggagccgaag ggaaaccgag tcttaactgg gcgtcgagtt gcatgatata gacccgaaac 720
 ccggtgatct agccatgggc aggttgaagg ttgggtaaca ctaactggag gaccgaaccg 780
 actaatggtg aaaaattagc ggatgacctg tggctggggg tgaaaggcca atcaaaccgg 840
 gagatagctg gttctccccg aaatctatct aggtagagcc ttatgtgaat accttcgggg 900
 gtagagcaact gtttcggcta gggggccatc ccggccttacc aaccgatgc aaactgcgaa 960
 taccgaagag taatgcatag gagacacacg gcgggtgcta acgttcgctc tggagagggg 1020
 aacaaccag accgccagct aaggtccca agtttatatt aagtgggaaa cgaagtggga 1080
 aggccttagac agctaggatg ttggcttaga agcagccatc atttaaagaa agcgtaatag 1140
 ctactagtc gagtcggcct gcgcggaaga tgtaacgggg ctcaaata gcaccgaagc 1200
 tgcggcatca ggcgtaagcc tgttgggtag gggagcgtcg tgtaagcggg agaaggtggt 1260
 tcgagagggc tgctggacgt atcacgagtg cgaatgctga cataagtaac gataaacgg 1320
 gtgaaaaacc cgttcgccgg aagaccaagg gttcctgtcc aacgttaatc ggggcaggg 1380
 gagtcggccc ctaaggcgag gctgaagagc gtagtcgatg ggaaacgggt taatattccc 1440
 gtacttgta taattgcgat gtggggacgg agtaggtag gttatcgacc tgttgaaaa 1500
 ggtcgttta gttgtaggt ggagcgtta ggcaaatccg gacgcttacc aacaccgaga 1560
 gatgatgacg aggcgctaag gtgccgaagt aaccgatacc acacttccag gaaaagccac 1620
 taagcgtcag attataataa accgtactat aaaccgacac aggtggtcag gtagagaata 1680
 ctcaggcgtc tgagagaact cgggtgaagg aactaggcaa aatagcaccg taacttcggg 1740
 agaaggtgcg ccggcgtaga ttgtagaggt atacccttga aggttgaacc ggtcgaagtg 1800
 acccgctggc tgcaactgtt tattaanaac acagcactct gcaaacacga aagtggacgt 1860
 ataggggtg atgcctgcc ggtgctggaa ggttaattga tggcgttacc gcaagagaag 1920
 cgctgatcg aagccccagt aaacggcggc cgtaactata acggtcctaa ggtagcgaag 1980
 ttccttgctg ggtaagtcc gacctgcacg aatggcataa tgatggccag gctgtctcca 2040
 cccgagactc agtgaaattg aaatcgccgt gaagatgctg tgtaccgctg gctagacgga 2100
 aagaccccgt gaacctttac tatagcttga cactgaacct tgaattttga tgtgtaggat 2160
 aggtgggag ctttgaagcg gtaacgccag ttatcgtgga gccatcctg aaataccacc 2220
 ctttaacggt tgatgttcta acgaagtgc ccgaacgggt actcggacag tgtctggtg 2280
 gtagtttgac tggggcggtc tcctcccaa gagtaacgga ggagcacgaa ggtttgctaa 2340
 tgacggctcg acatcgtcag gttagtcaa tggataaagc aagcttaact gcgagacgga 2400
 caagtcgagc aggtgcgaaa gcaggtcata gtgatccggt ggttctgaat ggaaggcca 2460

ES 2 715 930 T3

tcgctcaacg gataaaaggt actccgggga taacaggctg ataccgccca agagttcata	2520
tcgacggcgg tgtttggcac ctcgatgtcg gctcatcaca tcctggggct gaagtaggtc	2580
ccaagggat ggctgttcgc catttaaagt ggtacgcgag ctgggttaa aacgtcgtga	2640
gacagtttg tccctatctg ccgtgggcgt tggagaattg agaggggctg ctccctagtac	2700
gagaggaccg gagtggacgc atcactgggtg ttccggttgt gtcgccagac gcattgccgg	2760
gtagctacat gcggaagaga taagtgtga aagcatctaa gcacgaaact tgcctcgaga	2820
tgagttctcc cagtatttaa tactgtaagg gttggtggag acgacgacgt agataggccg	2880
ggtgtgtaag cgttgcgaga cgttgagcta accggtacta attgcccagag aggcttagcc	2940
atacaacgct caagtgtttt tggtagtga agttattacg gaataagtaa gtagtcaggg	3000
aatcggct	3008

<210> 3

<211> 4285

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> pSacB

<400> 3

ES 2 715 930 T3

tcgagaggcc	tgacgtcggg	cccggtagca	cgcgtcatat	gactagttcg	gacctagggg	60
tatcgtcgac	atcgatgctc	ttctgcgta	attaacaatt	gggatcctct	agactccata	120
ggccgcttcc	ctggctttgc	ttccagatgt	atgctctcct	ccggagagta	ccgtgacttt	180
atthtcggca	caaatacagg	ggtcgatgga	taaatacggc	gatagtttcc	tgacggatga	240
tccgtatgta	ccggcgggag	acaagctgca	aacctgtcag	atggagattg	atttaaatggc	300
ggatgtgctg	agagcaccgc	cccgtgaatc	cgcagaactg	atccgctatg	tgthttgcgga	360
tgattggccg	gaataaataa	agccgggctt	aatacagatt	aagcccgtat	agggattatt	420
tactgaatac	caaacagctt	acggaggacg	gaatgttacc	cattgagaca	accagactgc	480
cttctgatta	ttaatattht	tcactattaa	tcagaaggaa	taacctgaa	thttaccggg	540
attgacctga	atacctggaa	tcgcagggaa	cactthtccc	thtatcgtca	gcagattaaa	600
tgccgattca	gcctgaccac	caaactcgat	attaccgctt	tgccgtaccgc	actggcggag	660
acaggttata	agthttatcc	gctgatgatt	tacctgatct	cccgggctgt	taatcagtht	720
ccggagthcc	ggatggcact	gaaagacaat	gaactthttt	actgggacca	gtcagaccgc	780
gtctthactg	thtttcataa	agaaaccgaa	acattctctg	cactgtctctg	ccgtthtttt	840
ccggatctca	gtgagthttat	ggcaggthtat	aatgcggtaa	cggcagaata	tcagcatgat	900

ES 2 715 930 T3

accagattgt ttccgcaggg aaatttaccg gagaatcacc tgaatatatc atcattaccg 960
 tgggtgagtt ttgacgggat ttaacctgaa catcaccgga aatgatgatt attttgcccc 1020
 ggtttttacg atggcaaagt ttcagcagga aggtgaccgc gtattattac ctgtttctgt 1080
 acaggttcat catgcagtct gtgatggctt tcatgcagca cggtttatta atacacttca 1140
 gctgatgtgt gataacatac tgaataaat taattaattc tgtatttaag ccaccgtatc 1200
 cggcaggaat ggtggctttt tttttatatt ttaaccgtaa tctgtaattt cgtttcagac 1260
 tggttcagga tgagctcgct tggactcctg ttgatagatc cagtaatgac ctcagaacte 1320
 catctggatt tgttcagaac gctcggttgc cggcgggctg tttttattgg tgagaatcca 1380
 agcactagcg gcgcgccggc cggcccgggtg tgaataaccg cacagatgcg taaggagaaa 1440
 ataccgcatc aggcgctctt ccgcttctc gctcactgac tcgctgcgct cggtcgttcg 1500
 gctgcggcga gcggtatcag ctactcaaa ggcggtaata cggttatcca cagaatcagg 1560
 ggataacgca ggaaagaaca tgtgagcaaa aggccagca aaggccagga accgtaaaaa 1620
 ggccgcggtg ctggcgtttt tccataggct ccgccccct gacgagcatc acaaaaatcg 1680
 acgctcaagt cagaggtggc gaaaccgac aggactataa agataccagg cgtttcccc 1740
 tggaagctcc ctcgctcgct ctctgttcc gacctgccc cttaccggat acctgtccgc 1800
 ctttctccct tcgggaagcg tggcgctttc tcatagctca cgctgtaggt atctcagttc 1860
 ggtgtaggtc gttcgetcca agctgggctg tgtgcacgaa cccccgttc agcccgaccg 1920
 ctgcgcctta tccgtaact atcgtcttga gtccaaccog gtaagacacg acttatcgcc 1980
 actggcagca gccactggta acaggattag cagagcgagg tatgtaggcg gtgctacaga 2040
 gttcttgaag tgggtggccta actacggcta cactagaagg acagtatttg gtatctgcgc 2100
 tctgctgaag ccagttacct tcggaaaaag agttggtagc tcttgatccg gcaaacaaac 2160
 caccgctggt agcgtggtt tttttgttg caagcagcag attacgcgca gaaaaaagg 2220
 atctcaagaa gatccttga tcttttctac ggggtctgac gctcagtga acgaaaactc 2280
 acgttaaggg attttggca tgagattatc aaaaaggatc ttcacctaga tccttttaaa 2340
 ggccggccgc ggccgccatc ggcattttct tttgogtttt tatttgtaa ctgttaattg 2400
 tccttgttca aggatgctgt cttgacaac agatgttttc ttgccttga tgttcagcag 2460
 gaagctcggc gcaaacgttg attgtttgc tgcgtagaat cctctgtttg tcatatagct 2520
 tgtaatcacg acattgtttc ctttcgcttg aggtacagcg aagtgtgagt aagtaaaggt 2580
 tacatcgta ggatcaagat ccatttttaa cacaaggcca gttttgttca gcggcttgta 2640
 tgggccagtt aaagaattag aaacataacc aagcatgtaa atatcgtag acgtaatgcc 2700

ES 2 715 930 T3

gtcaatcgtc atttttgatc cgcgggagtc agtgaacagg taccatttgc cgttcatttt 2760
 aaagacgttc ggcggttcaa tttcatctgt tactgtgta gatgcaatca gcggtttcat 2820
 cacttttttc agtgtgtaat catcgtttag ctcaatcata cggagagcgc cgtttgctaa 2880
 ctcagccgtg cgttttttat cgctttgcag aagtttttga ctttcttgac ggaagaatga 2940
 tgtgcttttg ccatagtatg ctttgttaaa taaagattct tcgccttggg agccatcttc 3000
 agttccagtg tttgcttcaa atactaagta tttgtggcct ttatcttcta cgtagtgagg 3060
 atctctcagc gtatggttgt cgcctgagct gtagttgcct tcatcgatga actgctgtac 3120
 attttgatac gtttttccgt caccgtcaaa gattgattta taatcctcta caccgttgat 3180
 gttcaaagag ctgtctgatg ctgatacgtt aacttgtgca gttgtcagtg tttgtttgcc 3240
 gtaatgttta ccggagaaat cagtgtagaa taaacggatt tttccgtcag atgtaaagt 3300
 ggctgaacct gaccattctt gtgtttggtc ttttaggata gaatcatttg catcgaattt 3360
 gtcgctgtct ttaaagacgc ggccagcgtt tttccagctg tcaatagaag tttcgccgac 3420
 tttttgatag aacatgtaaa tcgatgtgtc atccgcattt ttaggatctc cggctaattg 3480
 aaagacgatg tggtagccgt gatagtttgc gacagtgccg tcagcgtttt gtaatggcca 3540
 gctgtcccaa acgtccaggc cttttgcaga agagatattt ttaattgtgg acgaatcaaa 3600
 ttcagaaact tgatattttt catttttttg ctgttcaggg atttgcagca tatcatggcg 3660
 tgtaatatgg gaaatgccgt atgtttcctt atatggcttt tggttcgttt ctttcgcaaa 3720
 cgcttgagtt ggcctcctg ccagcagtgc ggtagtaaag gttaatactg ttgcttgttt 3780
 tgcaaacttt ttgatgttca tcgttcatgt ctctttttt atgtactgtg ttagcggctt 3840
 gcttcttcca gccctcctgt ttgaagatgg caagttagtt acgcacaata aaaaaagacc 3900
 taaaatatgt aaggggtgac gccaaagtat acactttgcc ctttacacat tttaggtctt 3960
 gcctgcttta tcagtaacaa acccgcgcga tttacttttc gacctcattc tattagactc 4020
 tcgtttgat tgcaactggg ctattttcct cttttgttg atagaaaatc ataaaaggat 4080
 ttgcagacta cgggcctaaa gaactaaaa atctatctgt ttcttttcat tctctgtatt 4140
 ttttatagtt tctgttgcac gggcataaag ttgcctttt aatcacaatt cagaaaatat 4200
 cataatatct catttacta aataatagt aacggcaggt atatgtgatg ggttaaaaag 4260
 gatcggcggc cgctcgattt aaatc 4285

<210> 4
 <211> 7161
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>

ES 2 715 930 T3

<223> pSacB (delta pflD)

<400> 4

tcgagaggcc tgacgtcggg cccggtacca cgcgtcatat gactagttcg gacctagggg 60

tgggatcgag ctcttttctt tgccgacaag gcggaagctt taggggaaat tcccgtaggt 120

gccgtattgg tggatgaacg gggcaatata attggtgaag gctggaacct ctctattgtg 180

aactcggatc ccaccgcca tgccgaaatt attgctgtgc gtaacgccgc gcagaaaatc 240

caaaattacc gcctgctcaa taccacttta tacgtgactt tagaaccttg caccatgtgc 300

gccggcgcga ttttacacag ccgaatcaaa cgcttggtat tccggggcgc cgattacaaa 360

accggtgcgg tgggttccag atttcatttt tttgaggatt ataaaatgaa tcatgggggtt 420

gagatcacia gcggtgtctt ataggatcaa tgcagtcaga agttaagccg ctttttccaa 480

aagcgcaggg aacagaaaaa acaacaaaaa gctaccgcac ttttacaaca cccccggctt 540

aactcctctg aaaaatagtg acaaaaaaac cgtcataatg tttacgacgg tttttttatt 600

tcttctaata tgtcacatta agcccgtagc ctgcaagcaa ccccttaaca tgctccatta 660

attcttttgt cggcggtttt acatcttcaa gctcgtattt atcgccgagt acttcccatt 720

tatgggcgcc tagacggtga taaggtaata attccacttt ttcgatattc ttcatatctt 780

taatgaaatt ccccagcatg tgcaaatctt cgtcactata tgtataacce ggcactacia 840

catggcggat ccaggtacgc tgatttcgat ccgctaaata ttttgccaat tcgagcactc 900

ttttattcgg cacgccaatc aggctttcgt gaaccocgctc attcatttct ttcaggtcaa 960

gcaacacaag atccgtgtca tcaatcaatt catcaataat atgatcatga tgacggacga 1020

aaccgttggg atccaagcaa gtattaatc cttctttatg gcaggctctg aaccagtcct 1080

gtacaaatc cgctgtaaa atagcttca cgcgggaagc ggtaactccg cgcgccgagg 1140

cgttcataaa atggcgatag gtcaccactt ctttcattaa ttcttcaacg gaaatttctt 1200

taccgccgtg caaatcccag gtgtctctgt tatggcaata tttacaacgc attaaagcagc 1260

cttgtaaaaa taaaataaag cggattcccg gccctcaac tgtcccgcag gtttcaaatg 1320

aatgaattcg tcctaaaacc gacataatat gcccttaaat aatcaacaaa atatagcaag 1380

aagattatag caaagaattt cgtttttttc agagaatagt caaatcttcg caaaaaacta 1440

ccgcactttt atccgcttta atcaggggaa ttaaaacaaa aaaattccgc ctattgaggc 1500

ggaatttatt aagcaataag acaaaactctc aattttaata cttccttctt ttctagtatt 1560

gataagattg aaaccttgca aggatgacgg cggatttgcc gtcactctca cccaactaat 1620

gtggacgact ggtaaaccat tgcattagac caatgcaaac accaccaccg acgatgttac 1680

ES 2 715 930 T3

ctaaagtaac aggaattaaa tttttaatta ctaaattgga catatctaaa tttgcaaact 1740
 gctcggcatt taaacccggt gcctgccaga attccggcga tgcgaaattt gcaattacca 1800
 tgcccatagg gatcataaac atatttgcta cgcagtgttc aaagcctgaa gcgacaaaya 1860
 acccgatcgg caggatcata ataaaagctt tatccgtag agtyttgccg gcataggcca 1920
 tccaaacggc aatacatacc ataatggtgc aaagaatacc taaacagaag gcttcaaycc 1980
 aggtatgttc tattttatgt tgtgccgtat ttaaaatggt taatccccac tgaccgtttg 2040
 ccgcatgat ctgaccggaa aaccaaatta atgcaacaat aaataaacccg ccgacaaaat 2100
 taccgaarta aaccacaatc cagttacgta acatctgaat tgttgtaatt ttactctcaa 2160
 agcgggcaat agtcgataaa gttgatgaag taaatagttc acagccgcaa accgccacca 2220
 taattacccc gagagagaac accaaaccgc cgaccagttt agttaatccc caaggcgctc 2280
 ccgcagaggc tgtttgagtt gttgtataaa aaacgaatgc aagagcaata aacataccgg 2340
 cagagatcgc cgataaaaat gaataggctt gttttttcgt agctttataa acgccgacgt 2400
 ctaacccggt ttgagccatc tcggttggcg aagccatcca agccaattta aaatcttccg 2460
 atttcattga gctttcctta gtaataaaac tactcggaaa tgagtagaac tgccttaaag 2520
 cataaatgat agattaaaaa atccaaaatt gttgaatatt atttaacggg gggattataa 2580
 aagattcata aattagataa tagctaattt gagtgatcca tatcaccttt tacagatttt 2640
 ttgacctaaa tcaaaattac ccaaatagag taataatacc attataaagg gtgtggattt 2700
 attcctttgg tttacgagat aaattgctat ttaagctgat ttctgataaa aagtgcggta 2760
 gatttttccc aaaaataagg aaacacaaaa tggcagaaga aacaattttc agtaaaatta 2820
 ttcgtaaaga aattcccgcc gacattatat atcaagaoga tcttgtcacc gcatttcgcg 2880
 atattgcgcc gcaggcaaaa actcatatth taattattcc gaataaattg attccgacag 2940
 taaacgacgt aaccgcccac cgtcgacatc gatgotcttc tgcgtaatt aacaattggg 3000
 atcctctaga ctttgcttcc agatgatgc tctcctccgg agagtaccgt gactttattt 3060
 tcggcacaaa tacaggggtc gatggataaa tacggcgata gtttcctgac ggatgatccg 3120
 tatgtaccgg cggaagacaa gctgcaaacc tgtcagatgg agattgattt aatggcggat 3180
 gtgctgagag caccgccccg tgaatccgca gaactgatcc gctatgtgtt tgcggatgat 3240
 tggccggaat aaataaagcc gggcttaata cagattaagc ccgtataggg tattattact 3300
 gaataccaaa cagcttacgg aggacggaat gttaccatt gagacaacca gactgccttc 3360
 tgattattaa tatttttcac tattaatcag aaggaataac catgaatttt acccgattg 3420
 acctgaatac ctggaatcgc agggaacact ttgcctttha tcgtcagcag attaaatgcb 3480

ES 2 715 930 T3

gattcagcct gaccaccaa ctcgatatta ccgctttgcg taccgcaactg gcggagacag 3540
gttataagtt ttatccgctg atgatttacc tgatctcccg ggctgttaat cagtttccgg 3600
agttccggat ggcaactgaaa gacaatgaac ttatttactg ggaccagtca gaccgggtct 3660
ttactgtctt tcataaagaa accgaaacat tctctgcact gtcctgccgt tattttccgg 3720
atctcagtga gtttatggca ggttataatg cggtaacggc agaatatcag catgatacca 3780
gattgtttcc gcagggaaat ttaccggaga atcacctgaa tatatcatca ttaccgtggg 3840
tgagttttga cgggatttaa cctgaacatc accggaaatg atgattatth ttccccgggt 3900
tttacgatgg caaagtttca gcaggaaggt gaccgcgat tattacctgt ttctgtacag 3960
gttcatcatg cagtctgtga tggctttcat gcagcacggg ttattaatac acttcagctg 4020
atgtgtgata acatactgaa ataaattaat taattctgta ttaagccac cgtatccggc 4080
aggaatgggtg gctttttttt tatattttta ccgtaactctg taatttcggt tcagactggg 4140
tcaggatgag ctcgcttggc ctctgttga tagatccagt aatgacctca gaactccatc 4200
tggatttggt cagaacgctc ggttgccgc gggcgttttt tattggtgag aatccaagca 4260
ctagcggcgc gccggccggc ccggtgtgaa ataccgcaca gatgcgtaag gagaaaatac 4320
cgcatcaggc gctcttcgctc ttctctgctc actgactcgc tgcgctcggg cgttcggctg 4380
cggcgagcgg tatcagctca ctcaaaggcg gtaatacggg tatccacaga atcaggggat 4440
aacgcaggaa agaacatgtg agcaaaaggc cagcaaaagg ccaggaaccg taaaaggcc 4500
gogttgctgg cgtttttcca taggctccgc cccctgacg agcatcacia aaatcgacgc 4560
tcaagtcaga ggtggcgaaa cccgacagga ctataaagat accaggcgtt tccccctgga 4620
agctccctcg tgcgctctcc tgttccgacc ctgcogetta ccggatacct gtccgccttt 4680
ctcccttcgg gaagcgtggc gctttctcat agctcacgct gtaggtatct cagttcgggtg 4740
taggtcgttc gctccaagct gggctgtgtg cacgaacccc ccgttcagcc cgaccgctgc 4800
gccttatccg gtaactatcg tcttgagtcc aaccggtaa gacacgactt atcgccactg 4860
gcagcagcca ctggtaacag gattagcaga gcgaggtatg taggcgggtc tacagagttc 4920
ttgaagtggg ggcctaacta cggctacact agaaggacag tatttggtat ctgcgctctg 4980
ctgaagccag ttaccttcgg aaaaagagtt ggtagctctt gatccggcaa acaaaccacc 5040
gctggtagcg gtggtttttt tgtttgcaag cagcagatta cgcgcagaaa aaaaggatct 5100
caagaagatc ctttgatctt ttctacgggg tctgacgctc agtggaacga aaactcacgt 5160
taagggatth tggcatgag attatcaaaa aggatcttca cctagatcct tttaaaggcc 5220
ggccgcggcc gccatcggca tttcttttg cgtttttatt tgttaactgt taattgtcct 5280

ES 2 715 930 T3

tgttcaagga tgctgtcttt gacaacagat gttttcttgc ctttgatggt cagcaggaag 5340
 ctcggcgcaa acgttgattg tttgtctgcg tagaatctc tgtttgatcat atagcttgta 5400
 atcacgacat tgtttccttt cgcttgaggt acagcgaagt gtgagtaagt aaaggttaca 5460
 tcgtaggat caagatccat ttttaacaca aggccagttt tgttcagcgg cttgtatggg 5520
 ccagttaaag aattagaaac ataaccaagc atgtaaatat cgtagacgt aatgccgtca 5580
 atcgtcattt ttgatccgcg ggagtcagtg aacaggtacc atttgccgtt cattttaag 5640
 acgttcgcbc gttcaatttc atctgttact gtgtagatg caatcagcgg tttcatcact 5700
 tttttcagtg tgtaatcacc gtttagctca atcataccga gagcgccgtt tgctaactca 5760
 gccgtgctgt ttttatcgct ttgcagaagt ttttgacttt cttgacggaa gaatgatgtg 5820
 cttttgccat agtatgcttt gttaaataaa gattcttcgc cttggtagcc atcttcagtt 5880
 ccagtgtttg cttcaaatac taagtatttg tggcctttat cttctacgta gtgaggatct 5940
 ctcagcgtat ggttgcgccc tgagctgtag ttgccttcat cgatgaactg ctgtacattt 6000
 tgatacgttt ttccgtcacc gtcaaagatt gatttataat cctctacacc gttgatgttc 6060
 aaagagctgt ctgatgctga tacgttaact tgtgcagttg tcagtgtttg tttgccgtaa 6120
 tgtttaccgg agaaatcagt gtagaataaa cggatttttc cgtcagatgt aaatgtggct 6180
 gaacctgacc attcttgtgt ttggctcttt aggatagaat catttgcac gaatttgcg 6240
 ctgtctttaa agacgcggcc agcgtttttc cagctgtcaa tagaagtttc gccgactttt 6300
 tgatagaaca tgtaaatcga tgtgtcatcc gcatttttag gatctccggc taatgcaaag 6360
 acgatgtggt agccgtgata gtttgcgaca gtgccgtcag cgttttgtaa tggccagctg 6420
 tcccaaactg ccaggccttt tgcagaagag atatttttaa ttgtggacga atcaaattca 6480
 gaaacttgat atttttcatt tttttgctgt tcagggattt gcagcatatc atggcgtgta 6540
 atatgggaaa tgccgtatgt ttctttatat ggcttttggg tcgtttcttt cgcaaactg 6600
 tgagttgcbc ctctgccag cagtgcggtg gtaaaggtta atactgttgc ttgttttgca 6660
 aactttttga tgttcatcgt tcatgtctcc ttttttatgt actgtgtag cggctctgctt 6720
 cttccagccc tcctgtttga agatggcaag ttagttacgc acaataaaaa aagacctaaa 6780
 atatgtaagg ggtgacgcca aagtatacac tttgcccttt acacatttta ggtcttgcc 6840
 gctttatcag taacaaacc gcgcgattta cttttcgacc tcattctatt agactctcgt 6900
 ttggattgca actggtctat tttctcttt tgtttgatag aaaatcataa aaggatttgc 6960
 agactacggg cctaaagaac taaaaatct atctgtttct tttcattctc tgtatttttt 7020
 atagtttctg ttgcatggc ataaagttgc ctttttaatac acaattcaga aaatatcata 7080
 atatctcatt tcaactaata atagtgacg gcaggtatat gtgatgggtt aaaaaggatc 7140
 ggccggcct cgatttaaat c 7161

ES 2 715 930 T3

<210> 5

<211> 7112

<212> ADN

<213> Artificial

5 <220>

<223> pSacB (delta Idh)

<400> 5

```

tcgagaggcc tgacgtcggg cccggtacca cgcgtcatat gactagttcg gacctagggg      60
tatcgtcgac atcgatgctc ttctgcgtta attaacaatt gggatcctct agacccgggg      120
attccaacct gaagactggc tcggtatgac cgaaccgcgc aatattccgg gaaccagcac      180
tcaatatgct aactggcggc gccgtttaac cgcaaatata gaggatattt ttgccgatac      240
ggatattcaa catctgtaa aagaggtgaa tgctattcgt aaggaataat tttgttgcga      300
acgcaatgtg attttaacgg gtgccggata tggcaccctt atcaaacga cgaatattat      360
agacctctta cgatgacgca tctttcccca gatacgcagg attagacgga tgatgttacg      420
gaatatcccg tccctgtgcg gcaacataaa ccttaatcca ttcttcctca gtgaaggaaa      480
ttcgtaacgc atccgccgcg ctttttaccg gttcaatttt accggacccc ataaccggca      540
taatttttgc cggatgcgcc aataaccagg cataagccaa tgtatctaaa cgggtttctc      600
ctttcgtttc accgatttcg agtaatgttt tttgcaccgc ccgactgttc tcatcctgat      660
tgaataaacg accgccggca agtggcgacc atgccatcgg ttgaatacgt ttttccagta      720
aaaaatccag ggtaccgtca tcaaaagcct gacgatgaag aggcgaaatc tcaatttgat      780
tagtgattaa cggctgattc acataagatt gcaacatggc gaacttagcc ggcgtatagt      840
tagatacccc gaaataacgt actttyccgg tttgataaag ttcatacaaaa gcccgcgcga      900
tttgttcggg atccgcacag ggagaaagwc ggtgaatcag caatacatct aaatagtcgc      960
attgcagttt ttcaatggaa cgttgcgccg accacataat atggcggtag ctgttgtcat     1020
agtgatggga ttttatatcg ggtaattctt cattaggata caaaatcccg catttggtea     1080
ccaaagtaag ctgtgcgcgc aaggatttat ccagcgcagc cgcccgtccg aattccgcct     1140
cggaagtaaa agccccgtaa caagcggcat gatccagcgt atcaacgcct aattctaate     1200
cttgcttaac gaatgtaagc aattcctgcg gcgatttccg ccagcttttt aaccgccaga     1260
atccttgaat taagcgactg aatgttaaat cgggagccag ttgaatgtgt tgcataaaac     1320
ctccaaataa attgaatcaa acagacttaa gtataaatct ttaaagaaaa agtgcggtag     1380

```

ES 2 715 930 T3

aaaaatatgg attttccgca taaaaaaagc gtaccccgatt aggtacgcta ttaaaaatat 1440
aagcggcgct attctactct cttatggatc tcagtcaaga aaggatccgg caaccrccga 1500
acaaatggag rcgaaraaat tgaaaagacg aggaaatcag cgcgttaaaa attcccgaaa 1560
accacccgca ctttttattg gaatttgcta accttaaaag tgcggtcaaa aagttaaaaa 1620
ttttaagatt gcaattccaa cggattctta cccgctttac gcaaagcctg atgttcttta 1680
ataatcgcca taaaaggctg tccgaagcgc tgccatttga tggcgccgac accgttgatt 1740
tgcagcattt ccactttgct ggtcggctga tacaacgaca tttcctgcaa ggtcgcgtca 1800
ctgaacacaa tataaggcgg aatgttttct ttgtcggcaa tctgtttgcg caggaaacgc 1860
aggcgggcaa ataaatcttt gtcgtagttg gttaccgcat tgcggtgcg agcctgtacc 1920
atggtaatgg aagataatct cggcatggcc agttccaaag acacttcgcc gcgcagcacg 1980
ggacgcgcgc tttcggtgag ctgtaatctg gtcccatgc cgaaatcgct gatgatttgt 2040
tgcacaaagc ccaaatgaat cagctgacga attaccgatt gccagtattc tttgctttta 2100
tctttgccaa ttccgtagac tttcaactca tcatgttgat tttcttttat tttctgattc 2160
tgcaaaccgc gcattacgcc gattacgtat tgcgtgccga aacgttgccc ggtgcgataa 2220
atggtcgaaa ggattttctg cgcgtctaataaatccgtoat attttttcgg cggatcgagg 2280
cagatatcac agttattaca tggcgtttgg cggttttcgc cgaaataatt taacagcact 2340
aaacgacggc aggtctggct ttcggcaaat tcgccgatgg cttccagctt atgccgttta 2400
atatcccggt gcgggctttc cggctcttcc aataaaatth tatgcaacca ggcataatcc 2460
gccggtcgt aaaacagtac cgcttcgcgc ggcagggtcgt cccgccccgc gcgcccggtt 2520
tctgataat acgcctcaat gctgcgagat aaatcaaaat gcgccacaaa acgcacatta 2580
gatttgttga tccccatacc aaaagcaatg gtcgccacca ccacttgaat attatcccg 2640
tgaaacgcct gttgcaccgc ttcccgtgc gacggctcca tgcccgcag ataagcggct 2700
gcggaaatgc ctcttttctt cagggttcc gcaatgcgct ccactttgct acggctgttg 2760
caatagacga taccgctttt acctttttgc gccgccacaa aattgtataa ttgctccatc 2820
ggtttgaatt tttccaccaa ggtataacga atattcgggc ggtcaaaact acctacatac 2880
aagtgcgggt cgttcaggct gaccgggat ttaaactcgt agcgggctgc taaaggaagc 2940
ggaacacgta gaaagccagt ccgcagaaac ggtgctgacc ccggatgaat gtcagctact 3000
gggctatctg gacaagggaa aacgcaagcg caaagagaaa gcaggtagct tgcagtgggc 3060
ttacatggcg atagctagac tgggcggttt tatggacagc aagcgaaccg gaattgccag 3120
ctggggcgcc ctctggttaag gttgggaagc cctgcaaagt aaactggatg gctttcttgc 3180

ES 2 715 930 T3

cgccaaggat ctgatggcgc aggggatcaa gatctgatca agagacagga tgaggatcgt 3240
 ttcgcatgat tgaacaagat ggattgcacg caggttctcc ggccgcttgg gtggagagggc 3300
 tattcggcta tgactgggca caacagacaa tccgctgctc tgatgccgcc gtgttccggc 3360
 tgtcagcgca ggggcgcccg gttctttttg tcaagaccga cctgtccggt gccctgaatg 3420
 aactgcagga cgaggcagcg cggctatcgt ggctggccac gacgggcgtt cettgcgcag 3480
 ctgtgctcga cgttgtcact gaagcgggaa gggactggct gctattgggc gaagtgccgg 3540
 ggcaggatct cctgtcatct caccttgctc ctgccgagaa agtatccatc atggctgatg 3600
 caatgcggcg gctgcatacg ctgatccgg ctacctgcc attcgaccac caagcgaaac 3660
 atcgcatcga gcgagcacgt actcggatgg aagccggctct tgtcgatcag gatgatctgg 3720
 acgaagagca tcaggggctc gcgccagccg aactgttcgc caggctcaag gcgcgcatgc 3780
 ccgacggcga ggatctcgtc gtgacctatg gcgatgcctg cttgccgaat atcatggtgg 3840
 aaaatggccg cttttctgga ttcacgact gtggccggct ggggtgtggcg gaccgctatc 3900
 aggacatagc gttggctacc cgtgatattg ctgaagagct tggcggcgaa tgggctgacc 3960
 gcttctcgt gctttacggg atcgcgcgtc ccgattcgca gcgcatcgcc ttctatcgcc 4020
 ttcttgacga gttcttctga gcgggactct ggggttcgaa atgaccgacc aagcgacgcc 4080
 caacctgcca tcacgagatt tcgattccac cgcgccttc tatgaaagg tgggcttcgg 4140
 aatcgttttc cgggacgccg gctggatgat cctccagcgc ggggatctca tgctggagtt 4200
 cttcgcccac gctagcggcg cgcggccgg cccgggtgta aataccgcac agatgcgtaa 4260
 ggagaaaata ccgcatcagg cgctcttcg cttcctcgt cactgactcg ctgcgctcgg 4320
 tcgttcggct gcggcgagcg gtatcagctc actcaaaggc ggtaatacgg ttatccacag 4380
 aatcagggga taacgcagga aagaacatgt gagcaaaagg ccagcaaaag gccaggaacc 4440
 gtaaaaaggc cgcgttgctg gcgtttttcc ataggctccg cccccctgac gagcatcaca 4500
 aaaatcgacg ctcaagtcag aggtggcgaa acccgacagc actataaaga taccaggcgt 4560
 ttccccctgg aagctccctc gtgcgctctc ctgttccgac cctgccgctt accggatacc 4620
 tgtccgcctt tctcccttcg ggaagcgtgg cgotttctca tagctcacgc tgtaggtatc 4680
 tcagttcggg taggtcgtt cgctccaagc tgggctgtgt gcacgaacc cccgttcagc 4740
 ccgaccgctg cgccttatcc ggtaactatc gtcttgagtc caaccggta agacacgact 4800
 tatcgccaact ggcagcagcc actggtaaca ggattagcag agcgaggtat gtaggcgggtg 4860
 ctacagagtt cttgaagtgg tggcctaact acggctacac tagaaggaca gtatttggtg 4920
 tctgcgctct gctgaagcca gttacctcg gaaaaagagt tggtagctct tgatccggca 4980

ES 2 715 930 T3

aacaaaccac cgctggtagc ggtggttttt ttgtttgcaa gcagcagatt acgcgcagaa 5040
aaaaaggatc tcaagaagat cttttgatct tttctacggg gtctgacgct cagtggaacg 5100
aaaactcacg ttaagggatt ttggtcatga gattatcaaa aaggatcttc acctagatcc 5160
ttttaaaggc cggccgcggc cgccatcggc attttctttt gcgtttttat ttgttaactg 5220
ttaattgtcc ttgttcaagg atgctgtcct tgacaacaga tgttttcttg cttttgatgt 5280
tcagcaggaa gctcggcgca aacgttgatt gtttgtctgc gtagaatcct ctgtttgtca 5340
tatagcttgt aatcacgaca ttgtttcctt tcgcttgagg tacagcgaag tgtgagtaag 5400
taaaggttac atcgtagga tcaagatcca tttttaacac aaggccagtt ttgttcagcg 5460
gcttgtatgg gccagttaa gaattagaaa cataaccaag catgtaaata tcgttagacg 5520
taatgccgtc aatcgtcatt tttgatccgc gggagtcagt gaacaggta ctttgccgt 5580
tcattttaaa gacgttcgcg cgttcaattt catctgttac tgtgttagat gcaatcagcg 5640
gtttcatcac ttttttcagt gtgtaatcat cgtttagctc aatcataccg agagcgccgt 5700
ttgctaactc agccgtgctt tttttatcgc tttgcagaag tttttgactt tcttgacgga 5760
agaatgatgt gcttttgcca tagtatgctt tgttaaataa agattcttcg ccttggtagc 5820
catcttcagt tccagtgtt gcttcaaata ctaagtattt gtggccttta tcttctacgt 5880
agtgaggatc tctcagcgta tggttgtcgc ctgagctgta gttgccttca tcgatgaact 5940
gctgtacatt ttgatacgtt tttccgtcac cgtcaaagat tgatttataa tcctctacac 6000
cgttgatggt caaagagctg tctgatgctg atacgttaac ttgtgcagtt gtcagtgttt 6060
gtttgccgta atgtttaccg gagaaatcag tgtagaataa acggattttt ccgtcagatg 6120
taaagtggc tgaacctgac cattcttgtg tttggctttt taggatagaa tcatttgcac 6180
cgaatttgtc gctgtcttta aagacgcggc cagcgttttt ccagctgtca atagaagttt 6240
cgccgacttt ttgatagaac atgtaaactg atgtgtcacc cgcattttta ggatctccgg 6300
ctaatgcaaa gacgatgtgg tagccgtgat agtttgcgac agtgccgtca gcgttttgta 6360
atggccagct gtcccaaacg tccaggcctt ttgcagaaga gatattttta attgtggacg 6420
aatcaaattc agaaacttga tatttttcat ttttttgctg ttcagggatt tgcagcatat 6480
catggcgtgt aatatgggaa atgccgtatg tttccttata tggcttttg ttcgtttctt 6540
tcgcaaacgc ttgagttgcg cctcctgcca gcagtgcggg agtaaagggt aatactgttg 6600
cttgttttgc aaactttttg atgttcatcg ttcattgtct cttttttatg tactgtgtta 6660
gcggtctgct tcttccagcc ctctgtttg aagatggcaa gttagttacg cacaataaaa 6720
aaagacctaa aatatgtaag gggtgacgcc aaagtataca ctttgccctt tacacatttt 6780

ES 2 715 930 T3

aggtcttgcc	tgctttatca	gtaacaaacc	cgcgcgattt	acttttcgac	ctcattctat	6840
tagactctcg	tttggattgc	aactggtcta	ttttcctctt	ttgtttgata	gaaaatcata	6900
aaaggatttg	cagactacgg	gcctaaagaa	ctaaaaaatc	tatctgttcc	ttttcattct	6960
ctgtatTTTT	tatagtttct	gttgcatggg	cataaagttg	cctttttaat	cacaattcag	7020
aaaatatcat	aatatctcat	ttcactaaat	aatagtgaac	ggcaggtata	tgtgatgggt	7080
taaaaaggat	cggcggccgc	tcgatttaaa	tc			7112

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la producción fermentativa de ácido succínico o una sal o derivado de este, procedimiento que comprende las etapas de:
- 5 a. incubar una cepa bacteriana en un medio que contenga al menos glicerol como fuente de carbono asimilable y cultivar dicha cepa bajo condiciones que favorezcan la formación del ácido succínico deseado; y
- b. obtener dicho ácido succínico o sal o derivado de este del medio, en el que dicha cepa bacteriana es una cepa bacteriana de la familia de *Pasteurellaceae*, capaz de utilizar glicerol como una fuente de carbono para la producción fermentativa de ácido succínico, en el que dicha cepa contiene un gen mutado que codifica una enzima piruvato formato liasa con actividad disminuida o no detectable,
- 10 cuyo procedimiento comprende la producción fermentativa de ácido succínico y el control del pH con NH_4HCO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, NaOH, Na_2CO_3 , NaHCO_3 , KOH, K_2CO_3 , KHCO_3 , $\text{Mg}(\text{OH})_2$, $\text{MgH}(\text{CO}_3)_2$, $\text{Ca}(\text{OH})_2$, CaCO_3 , $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$, CaO, $\text{CH}_6\text{N}_2\text{O}_2$, $\text{C}_2\text{H}_7\text{N}$ y/o mezclas de estos.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la fermentación se realiza a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 10 a 60 °C a un pH de 5,0 a 9,0 en presencia de dióxido de carbono.
- 15 3. El procedimiento de una de las reivindicaciones 1 y 2, en el que una fuente de carbono asimilable adicional se selecciona de sacarosa, maltosa, maltodextrina, D-fructosa, D-galactosa, D-manosa, lactosa, D-glucosa, D-xilosa, L-arabinosa, rafinosa, productos de descomposición de almidón, celulosa, hemicelulosas y lignocelulosa; y mezclas de estos.
4. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que la fuente de carbono es una mezcla de glicerol y al menos una fuente de carbono adicional seleccionada de sacarosa, maltosa, D-fructosa, D-galactosa, lactosa, D-manosa, D-glucosa, D-xilosa, rafinosa y L-arabinosa.
- 20 5. El procedimiento de una de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la concentración de la fuente de carbono asimilable se ajusta a un valor en un intervalo de 5 a 80 g/l.
6. Un procedimiento para la producción fermentativa de ácido succínico o una sal o un derivado de este de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, procedimiento que adicionalmente se **caracteriza por** al menos una de las siguientes características:
- 25 a. conversión de al menos 25 g/l de glicerol en al menos 25,1 g/l de ácido succínico, con un coeficiente de rendimiento YP/S de al menos 1,0 g/g;
- 30 b. conversión de glicerol y opcionalmente al menos una fuente de carbono adicional seleccionada de sacarosa, maltosa, D-fructosa, D-glucosa, D-xilosa, L-arabinosa, D-galactosa, D-manosa y/o rafinosa en ácido succínico con un rendimiento de productividad específico de ácido succínico de al menos $0,58 \text{ g DCCW}^{-1} \text{ h}^{-1}$;
- 35 c. conversión de glicerol y opcionalmente al menos una fuente de carbono seleccionada de sacarosa, maltosa, D-fructosa, D-glucosa, D-xilosa, L-arabinosa, D-galactosa, lactosa, D-manosa y/o rafinosa en ácido succínico con un rendimiento de tiempo espacio para ácido succínico de al menos 2,2 g/(l h) de ácido succínico;
- 40 d. conversión de al menos 25 g/l de glicerol y opcionalmente al menos una fuente de carbono seleccionada de sacarosa, maltosa, D-fructosa, D-glucosa, D-xilosa, L-arabinosa, D-galactosa, lactosa, D-manosa y/o rafinosa en ácido succínico con un rendimiento espacio tiempo para el ácido succínico de al menos 2,2 g/(l h);
- 45 e. conversión de glicerol y opcionalmente al menos una fuente de carbono seleccionada de sacarosa, maltosa, D-fructosa, D-glucosa, D-xilosa, L-arabinosa, D-galactosa, lactosa, D-manosa y/o rafinosa, en ácido succínico con un rendimiento de productividad específico de ácido succínico de al menos $0,6 \text{ g DCCW}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y un rendimiento espacio tiempo para ácido succínico de al menos 2,2 g/(l h);
- f. producción de ácido succínico (SA) y productos secundarios (SSP) en una proporción SA/SSP de >10:1 o >12,5:1 o >15:1 o >17,5:1 o >20:1 o >25:1 o >30:1 o >33:1, en el que SSP representa la suma de productos secundarios ácido láctico (LA), ácido fórmico (FA), ácido acético (AA) y ácido málico (MA), cada cantidad se expresa en g/l;
- 50 g. producción de ácido succínico (SA) y el producto secundario ácido acético (AA) en una proporción SA/AA de >10:1 o >12,5:1 o >15:1 o >17,5:1 o >20:1 o >25:1 o >30:1 o >50:1 o >75:1 o >90:1, expresando cada cantidad en g/l,
- en el que dicha cepa bacteriana es una cepa bacteriana de la familia de *Pasteurellaceae*, capaz de utilizar glicerol como fuente de carbono para la producción fermentativa de ácido succínico, en el que dicha cepa

contiene un gen mutado que codifica una enzima piruvato formato liasa con actividad disminuída o no detectable, en el que dicha fuente de carbono asimilable comprende glicerol,

tal procedimiento comprende la producción fermentativa de ácido succínico y el control del pH con NH_4HCO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, NaOH , Na_2CO_3 , NaHCO_3 , KOH , K_2CO_3 , KHCO_3 , $\text{Mg}(\text{OH})_2$, $\text{MgH}(\text{CO}_3)_2$, $\text{Ca}(\text{OH})_2$, CaCO_3 , $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$, CaO , $\text{CH}_6\text{N}_2\text{O}_2$, $\text{C}_2\text{H}_7\text{N}$ y/o mezclas de estos.

- 5
7. El procedimiento de una de las reivindicaciones 1 a 6, realizado de manera discontinua o continua.
8. El procedimiento de una de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el ácido succínico y/o sus sales se aíslan y/o purifican adicionalmente mediante filtración, cristalización, electrodiálisis y/o cromatografía de intercambio catiónico.
- 10
9. El procedimiento de una de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el ácido succínico y/o sus sales se aíslan y/o purifican adicionalmente mediante las siguientes etapas:
- filtración seguida de
- cromatografía de intercambio catiónico seguida de
- cristalización.
- 15
10. El procedimiento de una de las reivindicaciones 8 y 9, en el que el material usado para la cromatografía de intercambio catiónico es una resina de intercambio catiónico en la forma H^+ que porta grupos de ácido sulfónico que tienen una capacidad total de 0,5 a 2,0 equivalentes/l de resina de intercambio catiónico.
11. El procedimiento de una de las reivindicaciones 8 a 10, en el que la cromatografía de intercambio catiónico se realiza a una temperatura de 45 a 60 °C.
- 20
12. Un procedimiento para la producción de tetrahidrofurano (THF) y/o 1,4-butanodiol (BDO) y/o gamma-butirolactona (GBL), que comprende
- a. la producción fermentativa de ácido succínico y/o sales de ácido succínico, como se define en las reivindicaciones 1 a 11, y
- b1. ya sea la hidrogenación catalítica directa del ácido libre obtenido en THF y/o BDO y/o GBL o
- b2. la esterificación química de ácido succínico libre y/o las sales de ácido succínico obtenidos para su correspondiente éster dialquilo inferior y la subsiguiente hidrogenación catalítica de dicho éster en THF y/o BDO y/o GBL.
- 25
13. Un procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que dicho glicerol, que se usa como fuente de carbono asimilable, se obtiene por escisión con éster de triacilglicéridos.
- 30
14. El procedimiento de la reivindicación 13, en el que glicerol es un producto de desecho obtenido de la fabricación de biodiesel.
15. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la cepa bacteriana de la familia de *Pasteurellaceae* pertenece a la especie *Basfia succiniciproducens*.
- 35
16. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la cepa bacteriana de la familia de *Pasteurellaceae* tiene un ADNr 16S de la SEQ ID NO: 1; o una secuencia, que muestra una identidad de secuencia de al menos 96, 97, 98, 99 o 99,9 %.
17. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la cepa bacteriana de la familia de *Pasteurellaceae* tiene un ADNr 23S de la SEQ ID NO: 2; o una secuencia, que muestra una identidad de secuencia de al menos 95, 96, 97, 98, 99 o 99,9 %.
- 40
18. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la cepa bacteriana muestra al menos una de las siguientes características metabólicas adicionales:
- a) producción de ácido succínico a partir de D-glucosa;
- b) producción de ácido succínico a partir de D-xilosa;
- c) crecimiento a concentraciones iniciales de glucosa de 75 g/l o más
- d) crecimiento a concentraciones iniciales de glicerol de 70 g/l o más.

ES 2 715 930 T3

19. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la cepa bacteriana convierte glicerol y adicionalmente sacarosa, maltosa, D-fructosa, D-glucosa, D-xilosa, L-arabinosa, D-galactosa, lactosa, D-manosa y/o rafinosa en ácido succínico con un coeficiente de rendimiento YP/S de al menos 0,5 g/g.
- 5 20. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la cepa bacteriana se deposita con DSMZ que tiene el número de depósito DSM 18541.
21. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la cepa bacteriana produce ácido succínico (SA) y el ácido fórmico como producto secundario (FA) en una proporción SA/FA de >90:1 o > 100:1, expresando cada cantidad en g/l.

Fig. 1 de 3

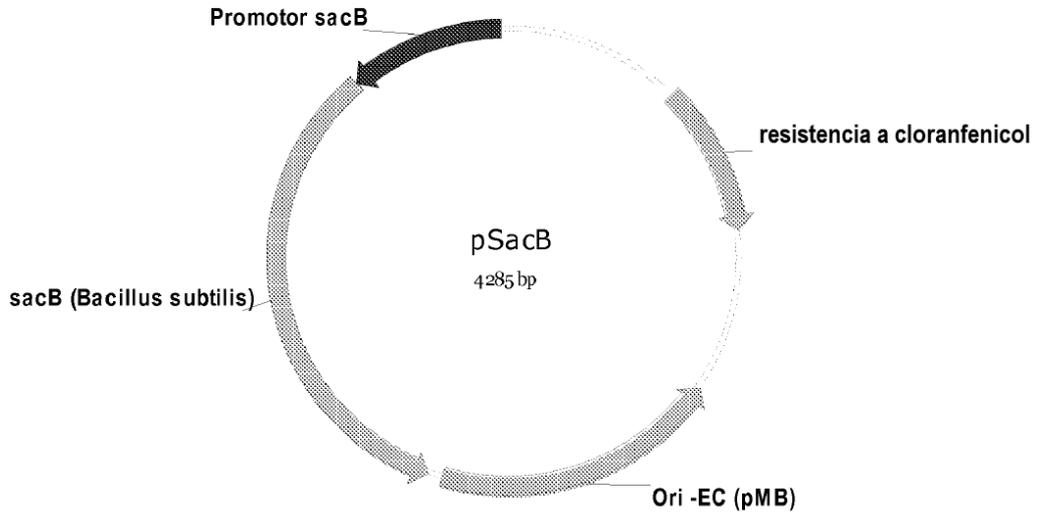


Fig. 2 de 3

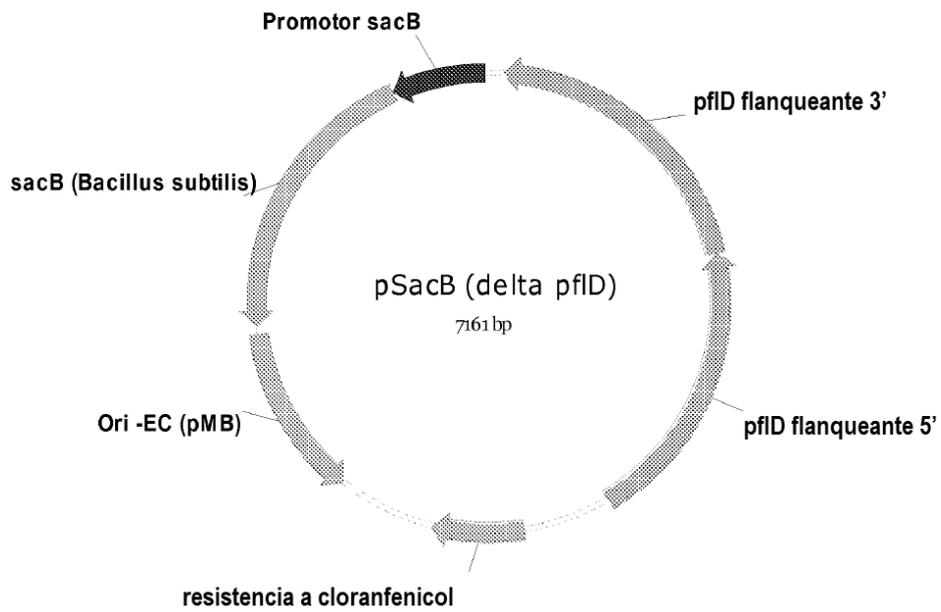


Fig. 3 de 3

