

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 410 083**

51 Int. Cl.:

**C12P 7/44** (2006.01)

**C12N 1/16** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.09.1998 E 98948100 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2013 EP 1114174**

54 Título: **Procedimiento para elaborar ácidos policarboxílicos**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**28.06.2013**

73 Titular/es:

**COGNIS IP MANAGEMENT GMBH (100.0%)  
HENKELSTRASSE 67  
40589 DÜSSELDORF, DE**

72 Inventor/es:

**ANDERSON, KEVIN W.;  
WENZEL, J. DOUGLAS;  
FAYTER, RICHARD G., JR. y  
MCVAY, KENNETH R.**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

**ES 2 410 083 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

Procedimiento para elaborar ácidos policarboxílicos

ANTECEDENTES DE LA INVENCION1. Campo de la Invención

- 5 Esta invención se refiere a un procedimiento para elaborar un ácido dicarboxílico saturado mediante la escisión oxidativa de uno o más dobles enlaces carbono-carbono internos en un compuesto alifático insaturado que tiene al menos un doble enlace carbono-carbono interno y al menos un grupo metilo terminal, un grupo carboxilo terminal y/o un grupo funcional terminal que es oxidable hasta un grupo carboxilo mediante biooxidación.

2. Descripción de la Técnica Relacionada

- 10 Los ácidos policarboxílicos alifáticos son productos intermedios químicos versátiles útiles como materias primas para la preparación de perfumes, polímeros, adhesivos y antibióticos macrólidos. Los ácidos dicarboxílicos alifáticos son una subclase especialmente importante de ácidos policarboxílicos que incluye ácidos comercialmente importantes tales como ácido adípico, ácido maleico, ácido sebácico, ácido acelaico, ácido dodecanodioico y ácido dímero. Estos ácidos dicarboxílicos normalmente se elaboran a partir de materiales de partida basados en petróleo, excepto el  
15 ácido acelaico (ácido nonanodioico) y el ácido sebácico (ácido decanodioico), que se producen a partir de grasas y aceites naturales en cantidades de varios millones de kilogramos.

El ácido acelaico se utiliza en la fabricación de elastómeros de uretano, películas y adhesivos de poliéster, plastificantes y lubricantes sintéticos. El ácido acelaico es el único ácido dicarboxílico alifático que tiene un número impar de átomos de carbono que está disponible en grandes cantidades.

- 20 El ácido acelaico se produce comercialmente mediante la ozonólisis de ácido oleico según se describe en la patente de EE. UU. 2.813.113. En general, el procedimiento implica la ozonización de ácido oleico para formar una mezcla de ozónidos y el tratamiento oxidativo posterior para formar ácido acelaico y ácido pelargónico en una cantidad aproximadamente equimolar. Una desventaja principal de este procedimiento es que cada mol de ácido oleico produce un mol de cada uno de ácido acelaico y ácido pelargónico, un subproducto menos deseable del  
25 procedimiento.

- Un modo de limitar o eliminar la producción de ácido pelargónico es la utilización del derivado de ácido  $\omega$ -dicarboxílico de ácido oleico, ácido 9-octadecenodioico, en lugar del ácido oleico. Puesto que el doble enlace carbono-carbono en el ácido 9-octadecenodioico es simétrico con respecto a los grupos ácido carboxílico terminales, el producto de ozonólisis de cada mol de ácido 9-octadecenodioico produciría 2 moles de ácido acelaico y no  
30 produciría ácido pelargónico.

- Aunque están disponibles varias rutas químicas para la síntesis de ácidos  $\alpha,\omega$ -dicarboxílicos de cadena larga tales como ácido 9-octadecenodioico, tales métodos son complejos y habitualmente dan como resultado mezclas que contienen longitudes de cadena más cortas. Como resultado, son necesarias etapas de purificación intensivas. Como una alternativa a las síntesis químicas, ácidos  $\alpha,\omega$ -dicarboxílicos de cadena larga tales como ácido 9-  
35 octadecenodioico se pueden elaborar a través de métodos de fermentación tales como la transformación microbiana de los correspondientes hidrocarburos tales como alcanos o alquenos, ácidos grasos o ésteres de los mismos. Un método para producir ácidos  $\alpha,\omega$ -dicarboxílicos sustancialmente puros con un rendimiento sustancialmente cuantitativo se describe en la patente de EE. UU. 5.254.466. Este método comprende cultivar una cepa de *C. tropicalis* en la que ambas copias del POX5 cromosómico y cada uno de los genes POX4A y POX4B se rompen en  
40 un medio de cultivo que contiene una fuente de nitrógeno, un sustrato orgánico y un cosustrato. Puesto que la fabricación de ácidos policarboxílicos tales como ácido acelaico con alto rendimiento a través de métodos químicos es difícil, sería deseable tener un método que diera como resultado ácidos policarboxílicos alifáticos con alto rendimiento con un mínimo de subproductos no deseados.

- Por lo tanto, un objetivo de la presente invención es proporcionar ácidos policarboxílicos alifáticos con alto  
45 rendimiento con un mínimo de productos no deseados. También es un objetivo de la presente invención proporcionar un tipo específico de ácidos policarboxílicos, los ácidos  $\alpha,\omega$ -dicarboxílicos, por medio de una combinación de métodos bioquímicos y químicos. Un objetivo adicional de la presente invención es proporcionar ácido acelaico con rendimientos incrementados con relación al procedimiento comercial existente mediante la ozonólisis de ácido 9-octadecenodioico producido mediante fermentación de *C. tropicalis* genéticamente modificada.

## 50 COMPENDIO DE LA INVENCION

En su aspecto más amplio, la presente invención se refiere a un procedimiento para elaborar un ácido dicarboxílico

5 saturado mediante un procedimiento que combina etapas de procedimiento bioquímicas y químicas. La primera etapa del procedimiento es una etapa de biooxidación que comprende fermentar una célula de *C. tropicalis* bloqueada por  $\beta$ -oxidación en la que ambas copias del gen POX5 cromosómico y los genes POX4A y POX4B cromosómicos se rompen en un medio de cultivo que está comprendido por una fuente de nitrógeno, un sustrato orgánico y un cosustrato. El sustrato orgánico es un compuesto alifático insaturado que tiene al menos un doble enlace carbono-carbono interno y al menos un grupo metilo terminal, un grupo carboxilo terminal y/o un grupo funcional terminal que es oxidable hasta un grupo carboxilo mediante biooxidación. Durante la fermentación, cada grupo metilo terminal y/o grupo funcional terminal que es susceptible de biooxidación se oxida hasta un grupo carboxilo. El compuesto así producido es un compuesto alifático que tiene al menos un grupo carboxilo y al menos un doble enlace carbono-carbono. La segunda etapa del procedimiento es una etapa de oxidación química que implica la reacción del producto de la primera etapa del procedimiento con un agente oxidante para escindir oxidativamente los dobles enlaces carbono-carbono hasta grupos carboxilo para formar uno o más ácidos dicarboxílicos saturados.

15 Una realización preferida de la presente invención es un procedimiento para elaborar ácido acelaico que comprende las etapas de: (1) fermentar una célula de *C. tropicalis* bloqueada por  $\beta$ -oxidación en la que ambas copias del gen POX5 cromosómico y los genes POX4A y POX4B cromosómicos se rompen en un medio de cultivo comprendido por una fuente de nitrógeno, ácido oleico y un cosustrato para producir ácido 9-octadecenodioico; (2) hacer reaccionar el ácido 9-octadecenodioico con un agente oxidante para producir ácido acelaico.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

20 La Figura 1 es una representación gráfica de la velocidad de producción de ácido 9-octadecenodioico según se indica en los Ejemplos 3, 5 y 6.

La Figura 2 es una representación gráfica de la velocidad de producción de ácido 9-octadecenodioico según se indica en los Ejemplos 7, 8 y 9.

#### DESCRIPCIÓN DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

25 Para los propósitos de la presente invención, un ácido policarboxílico es cualquier compuesto que tenga dos o más grupos carboxilo. Un doble enlace carbono-carbono interno es uno en el que cada átomo de carbono del doble enlace está unido a al menos otro átomo de carbono. El ejemplo más simple de un compuesto que tiene un doble enlace carbono-carbono interno es el 2-buteno.

30 La primera etapa del procedimiento según la invención comprende fermentar una célula de *C. tropicalis* bloqueada por  $\beta$ -oxidación en la que ambas copias del gen POX5 cromosómico y los genes POX4A y POX4B cromosómicos se rompen en un medio de cultivo que está comprendido por una fuente de nitrógeno, un sustrato orgánico y un cosustrato. El sustrato orgánico puede ser cualquier compuesto alifático insaturado que tenga al menos un doble enlace carbono-carbono interno y al menos un grupo metilo terminal, un grupo carboxilo terminal y/o un grupo funcional terminal que sea oxidable hasta un grupo carboxilo mediante biooxidación.

35 La célula de *C. tropicalis* bloqueada por  $\beta$ -oxidación es una cepa de *C. tropicalis* genéticamente modificada en la que se han roto los genes cromosómicos POX4A, POX4B y ambos POX5. El flujo de sustrato en esta cepa se redirige a la ruta de  $\omega$ -oxidación como resultado de la desactivación funcional de la ruta de  $\beta$ -oxidación competitiva mediante la ruptura de los genes POX. La cepa también puede tener uno o más gen de citocromo P450 (P450ALK) y/o genes de reductasa (P450RED) amplificados, lo que da como resultado un incremento en la cantidad de  $\omega$ -hidroxilasa limitativa de la velocidad a través de la amplificación del gen de P450 y un incremento en la velocidad de flujo de sustrato a través de la ruta de  $\omega$ -oxidación. Cepas preferidas son H5343, AR40 y R24. La cepa H5343 tiene el número de registro de la ATCC ATCC 20962 y se describe en la patente de EE. UU. 5.254.466. La cepa AR40 es una célula de *C. tropicalis* que es una célula de H5343 amplificada en la que los cuatro genes POX4 y ambas copias de los genes POX5 cromosómicos se rompen mediante un marcador seleccionable URA3 y que también contiene 3 copias adicionales del gen de citocromo P450 y 2 copias adicionales del gen de reductasa, el gen P450RED. La cepa AR40 tiene el número de registro de la ATCC ATCC 20987. La cepa R24 es una cepa H5343 amplificada en la que los cuatro genes POX4 y ambas copias de los genes POX5 cromosómicos se rompen mediante un marcador seleccionable URA3 y que también contiene múltiples copias del gen de reductasa. Las cepas AR40 y R24 se describen en la solicitud en tramitación con la presente número de serie 07/975.154, presentada el 11/12/92.

50 El sustrato orgánico es cualquier compuesto alifático insaturado que tenga al menos un doble enlace carbono-carbono interno y al menos un grupo metilo terminal, un grupo carboxilo terminal y/o un grupo funcional terminal que sea oxidable hasta un grupo carboxilo mediante biooxidación. Un grupo funcional terminal que es un derivado de un grupo carboxilo puede estar presente en la molécula de sustrato y se puede convertir en un grupo carboxilo mediante una reacción distinta a la biooxidación. Por ejemplo, si el grupo terminal es un éster, ni la *C. tropicalis* natural ni las modificaciones genéticas descritas en la presente memoria hidrolizarán la funcionalidad éster hasta un

grupo carboxilo. En tal caso, se puede añadir una lipasa durante la etapa de fermentación para liberar ácidos grasos libres.

5 Ejemplos de sustratos orgánicos que se pueden utilizar en el procedimiento según la invención incluyen, pero no se limitan a, olefinas internas tales como 2-penteno, 2-hexeno, 3-hexeno, 9-octadeceno; ácidos carboxílicos  
insaturados tales como ácido 2-hexenoico y ésteres del mismo, ácido oleico y ésteres del mismo incluyendo ésteres  
triglicéricos que tienen un contenido de ácido oleico relativamente alto, ácido erúxico y ésteres del mismo  
10 incluyendo ésteres triglicéricos que tienen un contenido de ácido erúxico relativamente alto, ácido ricinoleico y  
ésteres del mismo incluyendo ésteres triglicéricos que tienen un contenido de ácido ricinoleico relativamente alto,  
ácido linoleico y ésteres del mismo incluyendo ésteres triglicéricos que tienen un contenido de ácido oleico  
relativamente alto; alcoholes insaturados tales como 3-hexen-1-ol, 9-octadecen-1-ol; aldehídos insaturados tales  
como 3-hexen-1-al, 9-octadecen-1-al. Además de los anteriores, el sustrato orgánico que se puede utilizar en el  
procedimiento según la invención incluye compuestos alicíclicos que tienen al menos un doble enlace carbono-  
carbono interno y al menos un grupo metilo terminal, un grupo carboxilo terminal y/o un grupo funcional terminal que  
es oxidable hasta un grupo carboxilo mediante biooxidación. Ejemplos de tales compuestos incluyen, pero no se  
15 limitan a, 3,6-dimetil-1,4-ciclohexadieno; 3-metilciclohexeno; 3-metil-1,4-ciclohexadieno.

La etapa de fermentación se lleva a cabo preferiblemente en dos pasos. En el primer paso, un medio de cultivo se  
inocula con un cultivo activo de cepa de *C. tropicalis* bloqueada mediante  $\beta$ -oxidación, donde se produce un  
crecimiento exponencial rápido. En el segundo paso, que se produce a medida que el crecimiento celular del primer  
paso entra en fase estacionaria, se añade el sustrato, donde tiene lugar la biooxidación descrita en la presente  
20 memoria. Puesto que ya no se puede producir energía a partir del sustrato en cepas bloqueadas por  $\beta$ -oxidación, es  
necesario añadir un cosustrato. El cosustrato es un carbohidrato fermentable tal como glucosa, fructosa, maltosa,  
glicerol y acetato sódico. El cosustrato preferido es la glucosa, preferiblemente un sirope de glucosa líquido, por  
ejemplo, jarabe con 95% de equivalente de dextrosa, o jarabes con un equivalente de dextrosa incluso inferior. Tales  
materiales contienen pequeñas cantidades de disacáridos, trisacáridos y polisacáridos que se pueden hidrolizar  
25 durante la fermentación mediante la adición de una enzima amilasa tal como  $\alpha$ -amilasa, glucoamilasa y celulasa.  
Así, la glucosa se puede proporcionar in situ en una reacción simultánea a la biooxidación. Las condiciones y los  
procedimientos de fermentación eran aproximadamente los mismos que los divulgados en la patente de EE. UU.  
5.254.466.

La etapa de fermentación se puede modificar utilizando una grasa o aceite de triglicérido como la fuente tanto de  
30 sustrato orgánico como de cosustrato. Una lipasa, formulada con el caldo de fermentación, hidroliza o disocia la  
grasa o el aceite en ácidos grasos y glicerina. El consumo de glicerina por el organismo sirve para conducir la  
reacción de disociación hasta la terminación mientras suministra la energía necesaria para convertir los ácidos  
grasos libres en sus ácidos dibásicos correspondientes. Se prefieren particularmente lipasas que sean  
oleoespecíficas. Las lipasas oleoespecíficas exhiben una gran selectividad para un triglicérido que tiene un alto  
35 contenido de ácido oleico y catalizan selectivamente la hidrólisis de los grupos éster de oleato. Ejemplos de tales  
lipasas oleoespecíficas incluyen, pero no se limitan a, las lipasas producidas por *Pseudomonas* sp, *Humicola*  
*lanuginosa*, *Candida rugosa*, *Geotrichum candidum* y *Pseudomonas* (*Burkholderia*). Una lipasa particularmente  
preferida es UNLipasa de *Geotrichum candidum* nº ATCC 74170 descrita en la patente de EE. UU. 5.470.741.

La segunda etapa del procedimiento implica la reacción del producto de la primera etapa del procedimiento con un  
40 agente oxidante para escindir oxidativamente los dobles enlaces carbono-carbono en grupos carboxilo para formar  
un ácido policarboxílico. La escisión oxidativa de los dobles enlaces carbono-carbono se puede conseguir con  
cualquier agente oxidante conocido en la técnica que escinda oxidativamente un doble enlace carbono-carbono para  
formar dos grupos carboxilo. Tales métodos incluyen, pero no se limitan a, la reacción con ozono y el tratamiento  
oxidativo posterior de los ozónidos, según se describe en la patente de EE. UU. 2.813.113, la reacción con ácido  
45 túngstico en presencia de peróxido de hidrógeno, preferiblemente peróxido de hidrógeno al 60%, según se describe  
en WO 94/101122, la reacción con ácido crómico según se describe en la patente de EE. UU. 2.450.858, la reacción  
con hipoclorito en presencia de óxido de rutenio según se describe en J. Am. Oil Chem. Soc., 54, 870A (1977), la  
oxidación con permanganato según se describe en J. Am. Oil Chem. Soc., 54, 858A (1977), la oxidación con ácido  
peroxifórmico según se describe en la patente de EE. UU. 5.380.928, la oxidación con peróxido catalizada por  
50 bromuro de cobalto según se describe en la patente de EE. UU. 4.606.863, la oxidación con ácido fosfotúngstico  
catalizada por cloruro de cetilpiridinio según se describe en JP 0183639.

Una realización preferida de la presente invención es un procedimiento que forma uno o más ácidos dicarboxílicos  
saturados a partir de un solo sustrato de ácido dicarboxílico insaturado que contiene uno o más dobles enlaces  
carbono-carbono que están presentes en una cadena de carbonos terminada en al menos uno de los grupos  
55 carboxilo. El número total de átomos de carbono en el producto de ácido dicarboxílico saturado es igual al número  
de átomos de carbono en el ácido dicarboxílico insaturado. Por ejemplo, se forman 2 moléculas de ácido acelaico  
(ácido C<sub>9</sub>) oxidando el doble enlace carbono-carbono de una molécula de ácido 9-octadecenoico (ácido C<sub>18</sub>). En  
otro ejemplo, se forma una molécula de cada uno de ácido acelaico (ácido C<sub>9</sub>), ácido malónico (ácido C<sub>3</sub>) y ácido  
1,6-hexanodioico (ácido C<sub>6</sub>) oxidando los dos dobles enlaces carbono-carbono de una molécula de ácido linoleico  
60 (ácido 9,12-octadecadienoico, un ácido C<sub>18</sub>).

Otra realización preferida de la invención es la preparación de ácido acelaico mediante la biooxidación de ácido oleico para formar ácido 9-octadecenodioico seguido por la oxidación del ácido 9-octadecenodioico hasta ácido acelaico. Aunque se puede utilizar cualquier calidad de ácido oleico como el sustrato, un ácido oleico de calidad industrial típico consiste en los siguientes ácidos carboxílicos: 0,42% de C<sub>12</sub>; 2,7% de C<sub>14</sub>; 0,86% de C<sub>14:1</sub>; 6,3% de C<sub>16</sub>; 4,6% de C<sub>16:1</sub>; 0,93% de C<sub>17</sub>; 2,8 de C<sub>18</sub>; 71,8% de C<sub>18:1</sub>; 8,3% de C<sub>18:2</sub>; 0,58% de C<sub>18:3</sub>. El ácido oleico también puede ser un ácido oleico de alta calidad obtenido a partir de un ácido graso de una especie de *Helianthus annuus* (aceite de semillas de girasol) descrito, por ejemplo, en la Pat. de EE. UU. nº 4.627.192, cuyo contenido total se incorpora en la presente memoria mediante referencia. Tales aceites son muy ricos en ácido oleico y contienen al menos 80% en peso de oleico.

Después de que se haya obtenido el ácido 9-octadecenodioico mediante el método de biooxidación divulgado en la presente memoria, se hace reaccionar con ozono y se trata adicionalmente bajo condiciones oxidativas para dar ácido acelaico. A continuación, los productos de oxidación mixtos se oxidan adicionalmente hasta ácido acelaico como, por ejemplo, en el método divulgado en la patente de EE. UU. 5.420.316.

Un número de variaciones de la preparación de ácido acelaico anterior es contemplado por la presente invención. Por ejemplo, se pueden utilizar ésteres simples de ácido oleico tales como oleato de metilo, oleato de etilo y similares en lugar del ácido oleico en la producción de ácido 9-octadecenodioico, así como grasas y aceites naturales que tienen un contenido de ácido oleico relativamente alto.

Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar pero no limitar la invención.

## EJEMPLOS

### EJEMPLO 1

#### MÉTODO MEJORADO PARA PREPARAR ÁCIDOS DICARBOXÍLICOS

Un fermentador se cargó con un medio de crecimiento semisintético que tenía la composición 75 g/l de glucosa (anhidra), 6,7 g/l de base nitrogenada de levadura (Difco Laboratories), 3 g/l de extracto de levadura, 3 g/l de sulfato amónico, 2 g/l de fosfato monopotásico, 0,5 g/l de cloruro sódico. Los componentes se elaboraron como soluciones concentradas para tratar en autoclave y a continuación se añadieron al fermentador con enfriamiento: pH final aproximadamente 5,2. Esta carga se inoculó con 5-10% de un cultivo nocturno de *C. tropicalis* H5343 preparado en medio YM (Difco Laboratories) según se describió en los métodos de los Ejemplos 17 y 20 de la Patente de EE. UU. 5.254.466. A continuación, las células se cultivaron hasta aproximadamente 15 g de peso seco/l limitadas por el nitrógeno disponible en el medio. Había una cantidad en ligero exceso estequiométrico de glucosa en la carga anterior que permanecía durante alrededor de 4-5 horas después del agotamiento de las fuentes de nitrógeno. Se suministraron aire y agitación para mantener el oxígeno disuelto en más de aproximadamente 40% de saturación frente al aire. Un oxígeno disuelto inferior daba como resultado una acumulación in situ sustancial de productos catabólicos de glucosa parciales, principalmente etanol. El pH se mantuvo a alrededor de 5 mediante la adición de sosa caustica 5N durante el control del pH. Un ácido oleico de calidad industrial que tenía la siguiente composición: 0,30% de C<sub>12</sub>; 2,4% de C<sub>14</sub>; 0,60% de C<sub>14:1</sub>; 4,7% de C<sub>16</sub>; 4,6% de C<sub>18:1</sub>; 0,20% de C<sub>17</sub>; 0,80% de C<sub>18</sub>; 69,9% de C<sub>18:1</sub>; 10,50% de C<sub>18:2</sub>; 0,30% de C<sub>18:3</sub> se añadió (100 g/l) discontinuamente y la alimentación de cosustrato de glucosa (1,6 g/l/h) se inicia cerca del momento en el que el cultivo entra en fase estacionaria para iniciar la  $\omega$ -oxidación. Una pequeña cantidad de sosa caustica se añadió a lo largo del control del pH durante la transformación para mantener el pH en 5,0. No se formaba espuma en ningún momento durante la transformación. Después de un tiempo de transformación de 140 horas, el análisis por GLC del extracto de fermentación indicaba que 45% de los conteos de área C<sub>18:1</sub> totales aparecía como el diácido correspondiente, la mayoría del cual se acumulaba durante las últimas 70 horas de transformación. Otros componentes de la alimentación de ozono seguían un patrón similar. Sin embargo, se acumulaba poco diácido durante las 60 primeras horas de transformación.

### EJEMPLO 2

#### MÉTODO MEJORADO PARA PREPARAR ÁCIDOS DICARBOXÍLICOS

El siguiente método es una mejora sobre el método del Ejemplo 1 ya que acorta sustancialmente el período de inducción aparente saponificando parcialmente el ácido oleico para formar un jabón metálico antes de la adición al fermentador.

Así, una fermentación efectuada como en el Ejemplo 1 se modificaba añadiendo en primer lugar 0,0098 g de KOH y 0,04 g de agua por gramo de ácido oleico para saponificar parcialmente el ácido oleico. Esta mezcla se añadió a la fermentación para dar 50 g/l de ácido oleico en el caldo de fermentación. La reacción de saponificación se integra convenientemente con una esterilización térmica de la alimentación, si se desea, para conducir la reacción de saponificación hasta la terminación. En contraste con los resultados del Ejemplo 1, la acumulación de ácido dibásico

comenzaba en menos de 24 horas después de la adición de los ácidos grasos parcialmente saponificados. Después de un tiempo de transformación de 115 horas, 66,7% de los conteos de área C18:1 totales aparecía como el ácido dibásico. Se producía algo de espumación inicialmente durante la transformación, que se manejaba fácilmente por medios químicos o mecánicos.

### 5 EJEMPLO 3

#### PROCEDIMIENTO PARA ELABORAR ÁCIDO ACELAICO A PARTIR DE ÁCIDO 9-OCTADECENODIOICO

Ácido dibásico procedente del Ejemplo 2 se trata con un gas que contiene 5 v/o de ozono con el resto O<sub>2</sub> a una velocidad para suministrar 0,00644 mmoles de O<sub>3</sub> por minuto de ácido oleico presente en la mezcla de ácidos por minuto a lo largo de 2,5-3,0 horas a 23-25°C. El gas se suministra a través de un burbujeador convencional con un tamaño de poros de 147-174 mm. Posteriormente, nitrógeno gaseoso se burbujea en la mezcla de reacción posterior durante 15 minutos, a fin de liberar sustancialmente la mezcla de cualquier forma de oxígeno gaseoso.

Una cantidad de 23 gramos de una mezcla preparada como se describió anteriormente se pone en un reactor junto con 0,30 g de un catalizador de zeolita X Na. El reactor se pone en un baño de agua de temperatura controlada y se burbujea inicialmente con nitrógeno mientras la temperatura se mantiene 10° por debajo de la temperatura de reacción deseada de 60°C. El controlador de temperatura para el baño de agua se gradúa a continuación para incrementar la temperatura hasta la temperatura de reacción deseada. Cuando se alcanza la temperatura de reacción deseada en el baño de agua, el flujo de gas se cambia de nitrógeno a oxígeno a una velocidad de 350 ml/min. La reacción se continúa hasta que el contenido de peróxido alcanzaba alrededor de 0,25 mmoles de O-O/gramo mediante el método descrito en el Ejemplo 10 de U.S. 5.420.316. El producto debe contener ácido acelaico sustancialmente libre de ácido pelargónico.

### EJEMPLO 4

#### PROCEDIMIENTO PARA ELABORAR ÁCIDO 9-OCTADECENODIOICO UTILIZANDO UNA GRASA O ACEITE DE TRIGLICÉRIDO COMO LA FUENTE TANTO DE CARBOHIDRATO COMO DEL SUSTRATO ORGÁNICO

Un medio de fermentación que está comprendido por: (1) nutrientes y sales minerales de crecimiento, (2) un triglicérido con alto contenido de ácido oleico, y (3) una o más lipasas capaces de hidrolizar el aceite de triglicérido (tal como aceite de girasol o ricino de alto contenido de ácido oleico) se prepara e inocular con *C. tropicalis* H5343. Los nutrientes y las sales minerales de crecimiento se seleccionan para apoyar el crecimiento de *C. tropicalis* y mantener la actividad de los catalizadores de lipasa y *C. tropicalis*. Se incluye al menos una lipasa capaz de hidrolizar eficazmente ácidos grasos en las tres posiciones, sin embargo, si se desea, también se pueden utilizar lipasas específicas para 1,3 en combinación con la lipasa no selectiva. Si se desea, también se pueden añadir cantidades complementarias de carbohidrato, además de las disponibles estequiométricamente de la reacción de disociación de aceite. La fermentación resultante, junto con la disociación de aceite in situ, debe producir un producto que tenga un alto contenido de ácido 9-octadecenodioico.

### EJEMPLO 5

#### 35 PREPARACIÓN DE INÓCULO DE FERMENTADOR DE *CANDIDA TROPICALIS* H5343

*Candida tropicalis* H5343 se almacenó en viales de 2 ml con crioprotector de glicerol a de -60 a -70°C para la utilización como inóculo de fermentador. Las células se revivieron descongelando rápidamente un vial y pipeteando 1 ml de solución madre en 20 ml de caldo YM (Difco Laboratories) estéril. El caldo YM es un medio complejo adecuado para cultivar una amplia gama de levaduras y mohos. Este precultivo se incubó en un agitador orbital a 300 rpm a 30°C durante 15 horas. A continuación, se utilizaron 3 ml de este precultivo para inocular 500-550 ml de caldo YM estéril. Estos se incubaron posteriormente durante 14-18 horas en un agitador orbital a 300 rpm a 30°C para la utilización como inóculo del fermentador.

### EJEMPLO 6

#### CRECIMIENTO DE *CANDIDA TROPICALIS* H5343 PARA LAS FERMENTACIONES

45 Se seleccionó un medio de crecimiento semisintético para hacer crecer células de levadura que era similar al descrito previamente por Picataggio et ál. (Bio/technology, 10 1992, pp 894-898). El medio de crecimiento contenía (g/l a menos que se apunte otra cosa):

## ES 2 410 083 T3

Grupo 1		
	Glucosa	70
Grupo 2		
	Base Nitrogenada de Levadura	6,7
Grupo 3		
	Extracto de Levadura	3
Grupo 4		
	Sulfato Amónico	3
	Fosfato Monopotásico	2
	Cloruro Sódico	0,5
Grupo 5		
	Sulfato Magnésico	0,5
Grupo 6		
	Cloruro Cálcico	0,1
Grupo 7		
	Sulfato Ferroso	0,04
Grupo 8		
	Antiespumante	2 ml

La base nitrogenada de levadura y el extracto de levadura son ambos productos de Difco Laboratories. El antiespumante era SAG 471, un producto de Union Carbide. En algunos casos, se utilizaban componentes hidratados con la corrección apropiada para el agua de hidratación. Los componentes del grupo 4 se esterilizaron en el fermentador. Otros componentes se esterilizaron separadamente y se añadieron al fermentador después de enfriar. El grupo 7 se acidificó con ácido sulfúrico y a continuación se esterilizó en un filtro. El pH final de la mezcla era alrededor de 5,2. Las concentraciones de los componentes se ajustaron, según se apunta, en algunos ejemplos de oxidación de ácidos grasos. El fermentador era un fermentador Chemap de 20 litros equipado con un eje agitador de accionamiento inferior sobre el que estaban montadas tres turbinas Rushton y típicamente se cargaba con 10 litros de medio de crecimiento. El fermentador se inoculó con el inóculo preparado en el Ejemplo 5. La temperatura se mantuvo a 30-35°C y el oxígeno disuelto se mantuvo a 30% o más para prevenir la formación de etanol en presencia de glucosa en exceso utilizando una combinación de aireación, agitación y contrapresión del recipiente. Era difícil mantener un nivel de oxígeno disuelto de 30% cerca del final de la fase de crecimiento cuando la población celular se hacía bastante densa, y el nivel de oxígeno disuelto disminuiría por debajo de 30% durante un corto período de tiempo antes de que se produjera la fase estacionaria. El pH se controló en 5,0 utilizando bien hidróxido sódico 5N o bien hidróxido potásico 5N. A continuación, las células se cultivaron en crecimiento exponencial. Una fermentación típica consumía alrededor de 300 ml de base durante el crecimiento para el control del pH. La entrada en fase estacionaria comenzaba cuando el medio de cultivo se agotaba en nitrógeno y se detectaba fácilmente por un ascenso rápido en el oxígeno disuelto y un ascenso algo más lento en el pH. No se realizaron ajustes del pH para neutralizar los incrementos naturales de pH. La población en fase estacionaria final era  $4 \times 10^9$  UFC/ml o alrededor de 38 gramos de peso seco por litro. Una alimentación de glucosa utilizada como cosustrato (50% de glucosa en agua) se suministró al cultivo en fase estacionaria para el mantenimiento celular y para suministrar las necesidades energéticas asociadas con la producción de ácidos dicarboxílicos.

### EJEMPLO 7

## OXIDACIÓN DE ÁCIDO OLEICO HASTA ÁCIDOS DICARBOXÍLICOS

Una calidad industrial de ácido oleico que tenía la composición aproximada 0,3% de C<sub>12</sub>, 2,4% de C<sub>14</sub>, 0,6% de C<sub>14:1</sub>, 4,7% de C<sub>16</sub>, 4,6% de C<sub>16:1</sub>, 0,2% de C<sub>17</sub>, 0,8% de C<sub>18</sub>, 69,9% de C<sub>18:1</sub>, 10,5% de C<sub>18:2</sub>, 0,3% de C<sub>18:3</sub> se define como E267. Se preparó un cultivo en fase estacionaria utilizando el método del Ejemplo 2, excepto que utilizando 75 g/l de glucosa y omitiendo los grupos de componentes 5, 6 y 7. El pH se controló a pH 5 mediante la adición automática de hidróxido sódico 5N. La solución de alimentación de glucosa se suministró a 32 g/h y se añadieron discontinuamente 1000 g de E267 como la fase estacionaria que entraba en cultivo para iniciar la oxidación de E267 hasta ácidos dicarboxílicos. La oxidación de E267 avanzaba a pH 5 según se muestra en la Figura 1. Se consumían 180 ml adicionales de hidróxido sódico 5N y 2.057 g de solución de glucosa durante la oxidación de ácidos grasos. Sorprendentemente, no se requería antiespumante adicional durante la fase de oxidación y no se observaban problemas de viscosidad con el caldo de fermentación. El análisis cromatográfico de gases mostraba que se acumulaba ácido 9-octadecenoico hasta 20 g/kg. El análisis también mostraba que otros componentes de ácido graso de E267 se convertían asimismo en su correspondiente ácido dicarboxílico dando unos ácidos dicarboxílicos totales acumulados en el caldo de fermentación de 29 g/kg. Este ejemplo proporciona un método para preparar ácidos dicarboxílicos a un pH ácido. Las ventajas sobre los métodos previos en los que la oxidación se realiza a pH alcalino es que se necesita poco antiespumante costoso para el control de la espuma y se necesita menos base para mantener el pH. Aunque la base es relativamente económica, puede ocupar un volumen sustancial del fermentador, diluyendo el producto, requiriendo que se construya un recipiente de fermentador mayor. Los problemas de viscosidad se han anticipado pero no se observaban durante la fermentación.

### EJEMPLO 8

#### PREPARACIÓN DE UNA ALIMENTACIÓN DE ÁCIDO GRASO PARCIALMENTE SAPONIFICADO

Se ha encontrado que puede hacerse que la producción de ácidos dicarboxílicos comience mucho antes en la fermentación si los ácidos grasos se neutralizan parcialmente en primer lugar hasta sus jabones de ácido graso. En general, la extensión hasta la que se neutraliza parcialmente una alimentación de ácido graso a la fermentación será 5% o menos para provocar la inducción rápida de la producción de ácidos dicarboxílicos y la acumulación rápida de ácidos dicarboxílicos. Sin embargo, se ha encontrado que una alimentación parcialmente saponificada también puede ser eficaz para alterar las propiedades reológicas del caldo de fermentación. Reactivos de saponificación adecuados incluyen hidróxidos, carbonatos u óxidos metálicos. Además, se pueden utilizar cloruros, sulfatos o fosfatos metálicos con o sin un catalizador de saponificación. Estos se añaden al sustrato de fermentación de ácidos grasos para obtener neutralización parcial. La reacción de saponificación se ayuda mediante calentamiento y convenientemente se integra con un procedimiento de esterilización térmica si se desea. También se puede añadir una pequeña cantidad de agua tanto para ayudar a la esterilización como a la reacción de saponificación. Alternativamente, se pueden elaborar o adquirir jabones de ácido graso en los que los ácidos grasos están completamente neutralizados hasta un jabón metálico. Este se puede combinar con un sustrato de fermentación deseado para obtener la composición de inducción deseada.

### EJEMPLO 9

#### FERMENTACIÓN UTILIZANDO ÁCIDO OLEICO PARCIALMENTE SAPONIFICADO CON POTASIO

Un cultivo en fase estacionaria de *Candida tropicalis* H5343 se proporcionó como en el Ejemplo 7, excepto que se incluyeron 0,01 g/l de sulfato ferroso en el medio de cultivo. La solución de glucosa utilizada como cosustrato se suministró a 36 g/h durante la oxidación de ácidos grasos y el cultivo se mantuvo a pH 5 utilizando NaOH 5N. Se preparó un sustrato de E267 parcialmente saponificado añadiendo 4,9 gramos de hidróxido potásico y 20 gramos de agua a 500 gramos de E267. Esta mezcla se esterilizó en un autoclave de laboratorio durante 25 minutos para esterilizar la mezcla y completar la reacción de saponificación. Esto se añadió al cultivo en fase estacionaria para comenzar la oxidación. El pH se incrementaba hasta 5,7 pero disminuía de nuevo hasta 5,0 a medida de avanzaba la fermentación. La acumulación de ácido 9-octadecenoico se muestra en la Figura 1. Se consumían 140 gramos adicionales de solución de hidróxido sódico 5N para mantener el pH 5 y se consumían 15 ml de antiespumante para el control de la espuma. La adición de 166 gramos de E267 (no saponificado) durante la parte inicial de la fermentación no era eficaz para controlar la espuma. El caldo de fermentación final contenía de nuevo alrededor de 20 g/kg de ácido 9-octadecenoico o alrededor de 29 g/kg de ácidos dicarboxílicos totales.

### EJEMPLO 10

#### FERMENTACIÓN UTILIZANDO ÁCIDO OLEICO PARCIALMENTE SAPONIFICADO HASTA JABONES SÓDICOS

Se proporcionó un cultivo en fase estacionaria de *Candida tropicalis* H5343 como en el Ejemplo 9, excepto que el medio de crecimiento contenía 70 g/l de glucosa. La solución de glucosa utilizada como cosustrato se suministró a 36 g/h y el pH se mantuvo a pH 5 utilizando hidróxido sódico 5N. Se preparó un sustrato E267 parcialmente



saponificado añadiendo 3,5 gramos de hidróxido sódico y 30 gramos de agua a 500 gramos de E267. Esta mezcla se esterilizó en un autoclave de laboratorio a lo largo de 25 minutos para esterilizar la mezcla y completar la reacción de saponificación. La mezcla enfriada más 500 gramos adicionales de E267 (no saponificado) se añadieron al cultivo en fase estacionaria para comenzar la oxidación. El pH se incrementaba hasta 6,0 pero disminuía de nuevo hasta 5 a medida que avanzaba la fermentación. La acumulación de ácido 9-octadecenodioico se muestra en la Figura 1. Se consumían 100 gramos adicionales de solución de hidróxido sódico 5N para mantener el pH en 5, pero en contraste con la saponificación parcial de la alimentación hasta un jabón potásico, no se requería antiespumante para el control de la espuma. El caldo de fermentación final contenía 40 g/kg de ácido 9-octadecenodioico o alrededor de 57 g/kg de ácidos dicarboxílicos totales. Este método tiene la ventaja de una inducción y una acumulación rápidas de ácidos dicarboxílicos sin espumación y con excelentes características reológicas del caldo.

#### EJEMPLO 11

#### FERMENTACIONES COMPARATIVAS UTILIZANDO ÁCIDO OLEICO PARCIALMENTE SAPONIFICADO CON SODIO

Fermentaciones adicionales que utilizaban un sustrato E267 parcialmente saponificado hasta jabones sódicos revelaban que se producía frecuentemente un retraso entre la adición de este sustrato y el inicio de la producción de ácido dicarboxílico. El retraso duraba típicamente 6-10 horas y a continuación era seguido por una acumulación rápida de ácido dicarboxílico en el medio. La Figura 2 muestra un ejemplo representativo de este retraso en el que la fermentación producía finalmente 30 g/kg de ácido 9-octadecenodioico.

#### EJEMPLO 12

#### FERMENTACIÓN UTILIZANDO ÁCIDO OLEICO PARCIALMENTE SAPONIFICADO HASTA JABONES CÁLCICOS

Se proporcionó un cultivo en fase estacionaria de *Candida tropicalis* H5343 como en el Ejemplo 3, excepto que el medio de cultivo contenía 70 g/l de glucosa y 0,2 g/l de sulfato ferroso. La solución de glucosa utilizada como cosustrato se suministraba a 37 g/h y el cultivo se mantenía a pH 5 a 5,5 utilizando NaOH 5N. Se preparó un sustrato E267 parcialmente saponificado añadiendo 3,26 g de hidróxido cálcico y 30 g de agua a 500 gramos de E267. Esta mezcla se esterilizó en un autoclave de laboratorio a lo largo de 25 minutos para completar la reacción de saponificación. Esta mezcla se añadió al cultivo en fase estacionaria para comenzar la oxidación. La adición de esta mezcla hacía que el pH se incrementara hasta pH 5,7, pero el pH volvía a 5 a medida que avanzaba la fermentación. Una segunda carga de E267 parcialmente saponificado con calcio, similar a la primera carga, se añadió a la fermentación después de que la primera carga se hubiera oxidado hasta ácido 9-octadecenodioico en alrededor de 65 horas de tiempo de fermentación. La velocidad de alimentación de la solución de glucosa también se redujo hasta 7 g/h en 110 horas. La acumulación de ácido 9-octadecenodioico se muestra en la Figura 2. Se consumían 190 gramos adicionales de solución de hidróxido sódico 5N para el control del pH. No se producía espumación durante la oxidación y el caldo permanecía fluido. La fermentación producía un máximo de 42 g/kg de ácido 9-octadecenodioico o alrededor de 60 g/kg de ácidos dicarboxílicos totales. Este método tiene la ventaja de una inducción inmediata y una acumulación rápida de ácido 9-octadecenodioico sin espumación o problemas reológicos.

#### EJEMPLO 13

#### FERMENTACIÓN UTILIZANDO ÁCIDO OLEICO PARCIALMENTE SAPONIFICADO HASTA JABONES MAGNÉSICOS

Se preparó un cultivo en fase estacionaria de *Candida tropicalis* H5343 utilizando el método del Ejemplo 2. La solución de glucosa utilizada como cosustrato se suministró a 36 g/h durante la oxidación de ácidos grasos y el cultivo se mantuvo a pH 5 utilizando NaOH 5N. Se preparó un sustrato E267 parcialmente saponificado añadiendo 2,56 gramos de hidróxido magnésico y 30 g de agua a 500 gramos de E267. Esta mezcla se esterilizó en un autoclave de laboratorio para completar la reacción de saponificación. Esto se añadió al cultivo en fase estacionaria para comenzar la oxidación. El pH se incrementaba hasta 5,7 pero disminuía de nuevo hasta 5,0 a medida que avanzaba la fermentación. Se añadió una segunda carga de 500 gramos de alimentación saponificada de forma similar en alrededor de 40 horas de tiempo de fermentación. La acumulación de ácido 9-octadecenodioico en el caldo de fermentación se muestra en la Figura 2. Se consumían durante la oxidación 100 gramos adicionales de solución de hidróxido sódico 5N para mantener el pH 5. No se producía espumación y el caldo permanecía fluido. Esta fermentación producía un máximo de 28 g/kg de ácido 9-octadecenodioico o alrededor de 40 g/kg de ácidos dicarboxílicos totales.

#### EJEMPLO 14

**PROCEDIMIENTO ALTERNATIVO PARA ELABORAR ÁCIDOS DICARBOXÍLICOS**

Se preparó un cultivo en fase estacionaria de *Candida tropicalis* H5343 utilizando el método del Ejemplo 8, excepto que se omitía el cloruro sódico y se añadían 0,04 g/l de sulfato ferroso. La solución de glucosa utilizada como cosustrato se suministró en 31 g/h al cultivo en fase estacionaria y el pH se mantuvo en 5,0 utilizando hidróxido potásico 5N. Se preparó un sustrato E267 parcialmente saponificado añadiendo 0,65 g de hidróxido cálcico y 12 g de agua a 200 g de E267. Esta mezcla se esterilizó a lo largo de 25 min. en un autoclave de laboratorio para completar la reacción de saponificación. Esto se añadió al cultivo en fase estacionaria para comenzar la oxidación. Se observaban cambios de pH similares a los de los ejemplos previos. Partes alícuotas (de 250 a 290 gramos cada una) de E267 (no saponificado) se añadieron a la fermentación diariamente para dar una adición de E267 total final de 1.800 gramos. El pH del caldo se incrementó hasta entre 5,75 y 6,0 el segundo día de la fermentación. Se consumían 522 gramos adicionales de solución de hidróxido potásico 5N durante la fermentación. No se necesitaba antiespumante. Esta fermentación producía un máximo de 65 g/kg de ácido 9-octadecenodioico o alrededor de 93 g/kg de ácidos dicarboxílicos totales a lo largo de un tiempo de fermentación de 180 horas. El caldo de fermentación se volvía viscoso a medida que avanzaba la fermentación haciendo difíciles la agitación y la transferencia de oxígeno.

**EJEMPLO 15****CONTROL DE LA VISCOSIDAD UTILIZANDO SUSTRATOS DE ÁCIDO GRASO PRESAPONIFICADOS**

Se preparó un cultivo en fase estacionaria de *Candida tropicalis* H5343 como en el ejemplo 10. La solución de glucosa utilizada como cosustrato se suministró a 40 g/h pero se redujo hasta 25 g/h en un tiempo de fermentación de 84 h. El pH se mantuvo a pH 5 hasta un tiempo de fermentación de 36 horas, cuando se incrementaba hasta pH 5,7-5,9 utilizando solución de hidróxido potásico 5N. Se preparó un sustrato E267 parcialmente saponificado añadiendo 1,3 gramos de hidróxido cálcico y 12 gramos de agua a 200 g de E267. Esto se esterilizó para completar la reacción de saponificación y a continuación se añadió al cultivo en fase estacionaria para iniciar la producción de ácidos dicarboxílicos. Las adiciones de sustrato posteriores, que eran cada una partes alícuotas de 250 g de E267, se saponificaron parcialmente bien con 2,5 g de hidróxido potásico o bien con 1,6 g de hidróxido cálcico en 15 gramos de agua. Estas se añadieron diariamente a la fermentación para dar una adición de E267 total final a la fermentación de 1200 g. Se consumían 526 g adicionales de solución de hidróxido potásico para el control del pH. La fermentación utilizando este método producía un máximo de 59,1 g/kg de ácido 9-octadecenodioico u 85 g/kg de ácidos dicarboxílicos totales durante un tiempo de fermentación total de 150 horas. El caldo de fermentación no producía espumación y permanecía fluido utilizando la combinación de alimentaciones parcialmente saponificadas mientras que producía una gran concentración de ácidos dicarboxílicos.

**EJEMPLO 16****MÉTODO PARA CONVERTIR ÁCIDO PELARGÓNICO EN ÁCIDO ACELAICO**

Se preparó un cultivo utilizando el método del Ejemplo 11, excepto que en un tiempo de fermentación de 134 horas, una parte alícuota de 25 g de ácido pelargónico diluida con 225 g de disolvente E267 se añadía a la fermentación sin saponificación parcial. El análisis por GLC del caldo mostraba que casi todo el ácido pelargónico se oxidaba hasta ácido acelaico. Parecía haber poca acumulación adicional de ácido 9-octadecenodioico durante el tiempo que el ácido pelargónico se estaba oxidando hasta ácido acelaico.

**EJEMPLO 17****FENÓMENOS DE SEPARACIÓN DE FASES**

Se observó que una muestra de fermentación generada esencialmente utilizando el método del Ejemplo 11 y que contenía 0,9 g/kg de ácido oleico sin reaccionar y 37,4 g/kg de ácido 9-octadecenodioico se separaba espontáneamente, bajo gravedad, en dos fases líquidas y una fase sólida densa comprendida por las células de levadura a pH 6,0 y 70°C. El análisis de la fase líquida clara transparente mostraba que contenía solo 0,2 g/kg de ácido oleico y 0,3 g/kg de ácido 9-octadecenodioico. La fase líquida oleosa inferior contenía 0,9 g/kg de ácido oleico y 92,1 g/kg de ácido 9-octadecenodioico.

**EJEMPLO 18****UTILIZACIÓN DE LOS FENÓMENOS DE SEPARACIÓN DE FASES**

Una muestra de fermentación generada utilizando el método del Ejemplo 11 se ajustó hasta pH 6,15 utilizando solución de hidróxido potásico 5N y se recogió en un cilindro graduado de 100 ml. Toda la muestra contenía 0,8 g/kg de ácido oleico sin reaccionar y 58,1 g/kg de ácido 9-octadecenodioico. El cilindro se puso en un horno a 70°C

5 durante varias horas para observar la separación de fases posterior. Finalmente, la muestra daba 30 ml de la fase líquida clara de color ámbar, 22 ml de una fase oleosa ámbar y 50 ml de la misma fase oleosa pero ocluida con células. Para determinar el efecto de la centrifugación sobre la separación de fases, la misma muestra (40 ml) se puso en un tubo de centrifuga cónico a pH 6,15, se calentó hasta 70°C y a continuación se procesó durante un minuto en una centrífuga clínica. La muestra daba 20 ml de la fase líquida clara, 15 ml de la fase líquida oleosa y alrededor de 5 ml de pella celular. El método de este Ejemplo da una separación primaria inmediata de producto de la masa celular. La fase líquida ligera, que es baja en sustrato sin reaccionar y producto de ácido dicarboxílico, se puede reciclar a fermentaciones posteriores para reutilizar componentes valiosos en esta fase. La fase líquida densa oleosa está ahora enriquecida en ácidos dicarboxílicos y es adecuada para etapas de recuperación aguas abajo adicionales. Las células se retiran fácilmente y opcionalmente se pueden lavar para recuperar cualquier fase oleosa densa residual ocluida en los espacios intersticiales entre las células.

#### DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS

15 Cultivos vivos de *C. tropicalis* R40 denominada ATCC 20987 y cepa *C. tropicalis* 5343 (ATCC 20962) se han depositado en American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD 20852 bajo el El Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los fines del Procedimiento en Materia de Patentes.

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento para elaborar un ácido dicarboxílico saturado que comprende las etapas de: (1) fermentar una célula de *C. tropicalis* bloqueada por  $\beta$ -oxidación en la que ambas copias del gen POX5 cromosómico y los genes POX4A y POX4B cromosómicos se rompen en un medio de cultivo comprendido por una fuente de nitrógeno, un sustrato orgánico y un cosustrato, en el que dicho sustrato es un compuesto alifático insaturado que tiene al menos un doble enlace carbono-carbono interno y al menos un grupo metilo terminal, un grupo carboxilo terminal y/o un grupo funcional terminal que es oxidable hasta un grupo carboxilo mediante biooxidación para formar un ácido dicarboxílico insaturado que tiene uno o más dobles enlaces carbono-carbono en una cadena de carbonos terminada por al menos uno de los grupos carboxilo de dicho ácido dicarboxílico insaturado; (2) hacer reaccionar dicho ácido dicarboxílico insaturado con un agente oxidante para producir uno o más ácidos dicarboxílicos saturados.
- 10
- 15 2. El procedimiento según la reivindicación 1 para elaborar ácido acelaico que comprende las etapas de: (1) fermentar una célula de *C. tropicalis* bloqueada por  $\beta$ -oxidación en la que ambas copias del gen POX5 cromosómico y los genes POX4A y POX4B cromosómicos se rompen en un medio de cultivo comprendido por una fuente de nitrógeno, ácido oleico y un cosustrato para producir ácido 9-octadecenodioico; (2) hacer reaccionar el ácido 9-octadecenodioico con un agente oxidante para producir ácido acelaico.
- 20 3. El procedimiento según la reivindicación 2 para elaborar ácido acelaico que comprende las etapas de: (1) fermentar *C. tropicalis* H5343 en un medio de cultivo que comprende una fuente de nitrógeno, ácido oleico y un cosustrato para producir ácido 9-octadecenodioico; (2) hacer reaccionar el ácido 9-octadecenodioico con un agente oxidante para producir ácido acelaico.
- 25 4. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el agente oxidante se selecciona del grupo que consiste en ozono; ácido tungstíco-peróxido de hidrógeno; ácido crómico; hipoclorito-óxido de rutenio; permanganato; ácido peroxifórmico; bromuro de cobalto-peróxido de hidrógeno.
5. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el agente oxidante es ozono.
6. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho sustrato se deriva de un triglicérido que tiene un alto contenido de ácido oleico y en el que dicho medio de cultivo está comprendido además por una lipasa capaz de hidrolizar eficazmente dicho triglicérido en ácidos grasos y glicerina.
7. El procedimiento según la reivindicación 6, en el que dicha lipasa es una lipasa oleoespecífica.
- 30 8. El procedimiento según la reivindicación 7, en el que dicha lipasa oleoespecífica se selecciona del grupo que consiste en la lipasa procedente de *Pseudomonas* sp, *Humicola lanuginosa*, *Candida rugosa*, *Geotrichum candidum*, *Pseudomonas* (*Burkholderia*) y UNLipasa de *Geotrichum candidum* nº ATCC 74170.
9. El procedimiento según la reivindicación 8, en el que dicha lipasa es UNLipasa de *Geotrichum candidum* nº ATCC 74170.

35

Figura 1



