

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 642 237**

51 Int. Cl.:

B01D 11/04 (2006.01)
C07C 67/62 (2006.01)
C07C 227/40 (2006.01)
C07C 229/08 (2006.01)
B01J 39/04 (2007.01)
B01J 39/16 (2007.01)
C13B 20/14 (2011.01)
C02F 1/26 (2006.01)
C02F 101/34 (2006.01)
C02F 1/42 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.12.2011 E 11191520 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.08.2017 EP 2489432**

54 Título: **Procedimiento para la eliminación de un compuesto orgánico a partir de una disolución acuosa por medio de un intercambiador catiónico líquido, así como mezcla de reacción con este fin**

30 Prioridad:

16.02.2011 EP 11154707

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.11.2017

73 Titular/es:

**EVONIK DEGUSSA GMBH (100.0%)
Rellinghauser Strasse 1-11
45128 Essen, DE**

72 Inventor/es:

**ERHARDT, FRANK;
PFENNIG, ANDREAS;
PRZYBYLSKI, MARIE-DOMINIQUE;
HAAS, THOMAS;
ROOS, MARTIN;
DEMICOLI, DANIEL;
PÖTTER, MARKUS;
SCHUBERT, ANJA;
PFEFFER, JAN CHRISTOPH;
TACKE, THOMAS y
HÄGER, HARALD**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 642 237 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 la eliminación de un compuesto orgánico a partir de una disolución acuosa por medio de un intercambiador catiónico líquido, así como mezcla de reacción con este fin

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para la eliminación de un compuesto orgánico que presenta una o varias cargas positivas a partir de una disolución acuosa. Un problema fundamental en el caso de producción biotecnológica de productos químicos finos partiendo de materias primas regenerativas, que se sintetizan convencionalmente partiendo de combustibles fósiles, consiste en transformar el producto obtenido una vez, que se presenta típicamente en una fase acuosa de gran volumen, en una fase orgánica. Esta transformación se lleva a cabo por una parte para concentrar un producto intermedio o final acabado y para, en caso dado, posibilitar la elaboración sintética en los siguientes pasos de reacción en disolución orgánica, por otra parte para mejorar el rendimiento de la reacción en la fase acuosa mediante la eliminación del producto deseado, o para posibilitar en primer lugar el desarrollo de la reacción en un ámbito razonable técnicamente. La concentración térmica directa del producto, presente frecuentemente en concentraciones reducidas, a partir de la disolución acuosa de gran volumen no es razonable generalmente.

15 La distribución de un compuesto en un sistema bifásico que comprende una fase acuosa, hidrófila, y una fase orgánica, hidrófoba, que no se mezclan, depende considerablemente de las propiedades fisicoquímicas del respectivo compuesto. Mientras que los compuestos con una fracción elevada de hidrocarburos no sustituidos, o constituidos exclusivamente por los mismos, se concentran predominantemente en la fase hidrófoba, los compuestos con una fracción elevada de grupos polares, como funcionalidades que contienen heteroátomos, y muy especialmente compuestos con cargas, se presentan predominantemente, o prácticamente de manera exclusiva en la fase acuosa, lo que dificulta una transformación en una fase orgánica.

La distribución de un compuesto con el citado sistema bifásico tras ajuste del equilibrio se describe frecuentemente con ayuda de coeficientes de distribución, a modo de ejemplo según la ecuación de Nernst

$$\alpha = C_{\text{fase1}} / C_{\text{fase2}}$$

25 Un coeficiente de distribución especial es K_{ow} , también denominado valor P, que caracteriza el equilibrio de distribución entre una fase de octanol y una fase acuosa:

$$K_{ow} = P = C_{\text{Octanol}} / C_{\text{agua}}$$

30 Constituyen un ejemplo de un compuesto orgánico de carga positiva, bastante demandado industrialmente, ácido 12-aminoláurico (ALS) y sus derivados, en especial el éster metílico (ALSME). ALS es un producto de partida importante en la producción de polímeros, a modo de ejemplo para la producción de sistemas de conducción y nylon. Convencionalmente se produce ALS partiendo de materias primas fósiles en un proceso con rendimiento reducido a través de laurilactama, que se sintetiza mediante trimerización de butadieno, subsiguiente hidrogenación bajo formación de ciclododecano, oxidación subsiguiente a ciclododecanona, reacción con hidroxilaurina y subsiguiente transposición de Beckmann. En el documento DE10200710060705 se describe una vía mucho más prometedora para la producción biotecnológica de ALS, o bien ALSME.

40 El estado de la técnica enseña la obtención de compuestos orgánicos de carga positiva mediante puesta en contacto de una mezcla de reacción acuosa, que comprende un agente biológico con una fase orgánica, que comprende un disolvente orgánico. De este modo, por ejemplo el documento DE10200710060705 describe la obtención del producto ALSME mediante agitación con acetato de etilo a partir de una mezcla de reacción acuosa. Asano *et al.* (2008) dan a conocer la extracción de ALS con tolueno a partir de una disolución de reacción acuosa que comprende un enzima que sintetiza ALS.

El documento WO 98/02411 describe un procedimiento para la purificación de aminoácidos, extrayéndose una fase que comprende el aminoácido con una fase no miscible con esta fase. La fase en la que se extrae contiene aminos y ácidos grasos en este caso.

45 Por lo tanto, la presente invención toma como base la tarea de desarrollar un procedimiento para la eliminación de compuestos orgánicos de carga positiva, especialmente ácidos ω -aminocarboxílicos, con al menos una carga positiva a partir de una mezcla de reacción acuosa, siendo deseable una posición lo más ventajosa posible del equilibrio de distribución entre mezcla de reacción y una fase orgánica hidrófoba empleada como agente de extracción, es decir, debiéndose situar el equilibrio de distribución lo más posible en el lado de la fase hidrófoba orgánica.

Otra tarea que motiva la invención consiste en desarrollar un procedimiento para la eliminación de compuestos orgánicos con al menos una carga positiva, especialmente ácidos ω -aminocarboxílicos, a partir de una disolución acuosa que comprende un agente biológico, bajo empleo de una fase hidrófoba orgánica como agente de extracción, en el que el equilibrio de distribución se sitúa lo más posible en el lado de la fase hidrófoba orgánica.

- 5 Otra tarea que motiva la invención consiste en desarrollar un procedimiento para la eliminación de compuestos orgánicos con al menos una carga positiva, especialmente ácidos ω -aminocarboxílicos, a partir de una disolución acuosa bajo empleo de una disolución hidrófoba orgánica como agente de extracción, que reduce, o bien retrasa lo menos posible el crecimiento de microorganismos relevantes desde el punto de vista biotecnológico, en especial *Escherichia coli*, y/o en este caso reduce lo menos posible el número de células aptas para división y/o viables y/o
10 activas desde el punto de vista respiratorio y/o activas desde el punto de vista metabólico y sintético.

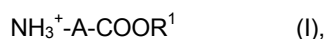
La invención toma finalmente como base la tarea de hallar un procedimiento para la eliminación de un compuesto orgánico con al menos una carga positiva, especialmente ácidos ω -aminocarboxílicos, a partir de una disolución acuosa que comprende un agente biológico bajo empleo de una fase hidrófoba orgánica como agente de extracción, en el que se optimiza la totalidad de propiedades decisivas para el rendimiento, la conversión total y la rápida
15 viabilidad de un procedimiento de síntesis biotecnológico básico, en especial la toxicidad de la fase orgánica frente al agente biológico y la absorción del compuesto en el agente de extracción orgánico, respecto al rendimiento total o a un rápido desarrollo o, en el caso de un proceso continuo, una empleabilidad lo más larga posible del agente biológico, especialmente para el caso de que el compuesto orgánico con al menos una carga positiva represente el producto o un producto intermedio del procedimiento de síntesis, que se sintetiza bajo participación de una actividad
20 catalítica.

Esta y otras tareas se resuelven mediante el objeto de las reivindicaciones independientes adjuntas, resultando formas de realización de las reivindicaciones subordinadas.

La tarea que motiva la invención se resuelve en un primer aspecto mediante un procedimiento para la eliminación de un compuesto que presenta una o varias cargas positivas a partir de una disolución acuosa, que comprende los
25 pasos

- a) Puesta a disposición de la disolución acuosa que contiene el compuesto orgánico y una disolución hidrófoba orgánica, que comprende un intercambiador catiónico líquido, siendo hidrófobo el intercambiador catiónico líquido,
b) Puesta en contacto de la disolución acuosa y la disolución orgánica, y
30 c) Separación de la disolución orgánica de la disolución acuosa,

tratándose, en el caso del compuesto orgánico, de un compuesto de la fórmula I



siendo R¹ hidrógeno, metilo, etilo o una carga negativa, y siendo A un grupo alquileo no sustituido, de cadena lineal, con al menos tres, preferentemente al menos ocho átomos de carbono, y tratándose de un ácido graso insaturado en el caso del intercambiador catiónico líquido.
35

En una primera forma de realización del primer aspecto, el problema se resuelve mediante un procedimiento según una de las reivindicaciones 1, ascendiendo la temperatura en el paso b) a 28 hasta 70, preferentemente a 30 hasta 37°C.

40 En una segunda forma de realización, que es también una forma de realización de la primera forma de realización del primer aspecto, el problema se soluciona mediante un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 2, ascendiendo el valor de pH en el paso b) a 6 hasta 8, preferentemente a 6,2 hasta 7,2.

En una tercera forma de realización, que es también una forma de realización de la primera a la segunda forma de realización del primer aspecto, el problema se soluciona mediante un procedimiento, ascendiendo la proporción
45 cuantitativa de sustancias de intercambiador catiónico líquido a compuesto orgánico al menos a 1.

En una tercera forma de realización, que es también una forma de realización de la primera a la tercera forma de realización del primer aspecto, el problema se soluciona mediante un procedimiento, ascendiendo la proporción volumétrica de disolución orgánica respecto a disolución acuosa a 1 : 10 hasta 10 : 1.

En una cuarta forma de realización, que es también una forma de realización de la primera a la tercera forma de realización del primer aspecto, el problema se soluciona mediante un procedimiento, siendo el intercambiador
50

catiónico líquido un ácido graso con más de 12, preferentemente con 14 a 22, de modo aún más preferente 16 a 18 átomos de carbono.

5 En una quinta forma de realización, que es también una forma de realización de la primera a la cuarta forma de realización del primer aspecto, el problema se soluciona mediante un procedimiento, siendo el intercambiador catiónico líquido ácido oleico o ácido erúxico.

En una sexta forma de realización, que es también una forma de realización de la primera a la quinta forma de realización del primer aspecto, el problema se soluciona mediante un procedimiento, comprendiendo la disolución acuosa además una célula.

10 En una séptima forma de realización, que es también una forma de realización de la primera a la sexta forma de realización del primer aspecto, el problema se soluciona mediante un procedimiento, siendo la célula preferentemente una célula bacteriana, y presentando la célula de modo aún más preferente una alcano monooxigenasa recombinante, una transaminasa recombinante, así como, preferentemente, al menos un enzima del grupo que comprende una alcohol dehidrogenasa, una alanina dehidrogenasa, y el producto génico AlkL.

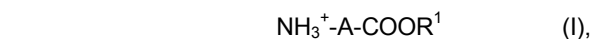
15 En una octava forma de realización, que es también una forma de realización de la primera a la séptima forma de realización del primer aspecto, el problema se soluciona mediante un procedimiento, conteniendo además la disolución orgánica al menos un disolvente orgánico, preferentemente un ácido graso y/o un éster de ácido graso.

20 En una novena forma de realización, que es también una forma de realización de la primera a la octava forma de realización del primer aspecto, el problema se soluciona mediante un procedimiento según la reivindicación 12, comprendiendo la disolución orgánica como intercambiador catiónico líquido un 20 a un 80 % en volumen, preferentemente un 25 a un 75 % en volumen de ácido oleico, y como disolvente laurato de metilo, y tratándose, en el caso del compuesto orgánico, de 12-aminolaurato de metilo, y estando presente en la disolución acuosa una célula bacteriana, que presenta una alcano monooxigenasa recombinante, una transaminasa recombinante, así como, preferentemente, además al menos un enzima del grupo que comprende una alcohol dehidrogenasa, una alanina dehidrogenasa, y el producto génico AlkL.

25 En un segundo aspecto, el problema que motiva la invención se soluciona mediante una mezcla de reacción que comprende una disolución acuosa y una disolución hidrófoba orgánica,

comprendiendo la disolución hidrófoba orgánica un ácido graso insaturado como intercambiador catiónico líquido,

y conteniendo la disolución acuosa un compuesto de la fórmula I



siendo R¹ hidrógeno, metilo, etilo o una carga negativa, y siendo A un grupo alquileo no sustituido, de cadena lineal, con al menos tres, preferentemente al menos ocho átomos de carbono.

35 En una forma de realización del segundo aspecto, el problema que motiva la invención se soluciona mediante una mezcla de reacción según el primer aspecto, comprendiendo la disolución acuosa además una célula, que presenta una alcano monooxigenasa recombinante, una transaminasa recombinante, así como preferentemente, además, al menos un enzima del grupo que comprende una alcohol dehidrogenasa, una alanina dehidrogenasa y el producto génico AlkL.

40 Los inventores de la presente invención han descubierto que la eficiencia de la eliminación de un compuesto orgánico con una o varias cargas positivas a partir de una disolución acuosa en una disolución hidrófoba orgánica se puede acrecentar sorprendentemente si esta disolución orgánica comprende un intercambiador catiónico líquido. Sin desear limitarse a una teoría, los inventores de la presente invención sospechan que la carga negativa, o bien las cargas negativas del intercambiador catiónico líquido interacciona/interaccionan con la carga positiva o las múltiples cargas positivas, y que esta interacción conduce a un enmascarado de al menos una carga positiva, que aumenta la solubilidad en la fase orgánica.

45 En una forma de realización preferente, el concepto "intercambiador catiónico líquido", como se emplea en este caso, significa un compuesto soluble en un disolvente hidrófobo orgánico, que, debido a una o varias cargas negativas permanentes, es apto para formar una interacción iónica con al menos un catión. Típicamente, un intercambiador catiónico líquido comprende al menos una cadena de hidrocarburo saturada o insaturada, que puede ser lineal o ramificada, así como un grupo de carga negativa, a modo de ejemplo un grupo carboxi.

Según la presente invención, en el caso del intercambiador catiónico líquido se trata de un ácido graso insaturado, a modo de ejemplo ácido oleico.

5 En una forma de realización preferente, el intercambiador iónico líquido presenta no solo una carga total negativa, sino que incluso no presenta carga positiva en absoluto. En una forma de realización preferente, bajo el concepto "carga total" del intercambiador iónico o de otra molécula, como se emplea en este caso, se entiende la suma de cargas de todos los grupos funcionales unidos a la molécula mediante enlace covalente. A modo de ejemplo, ácido láurico presenta a pH 7 una carga negativa como carga total, independientemente de la presencia de moléculas o contraiones ulteriores, como iones potasio, que están presentes en la disolución acuosa.

10 En una forma preferente de realización de la presente invención, bajo el concepto "puesta en contacto", como se emplea en este caso, se entiende que dos fases se oponen a una barrera física, como una membrana, directamente y en especial sin conexión intermedia. En el más sencillo de los casos, la puesta en contacto se efectúa introduciéndose ambas fases en el mismo recipiente y mezclándose las mismas entre sí de modo apropiado, a modo de ejemplo mediante agitación.

15 En una forma de realización preferente, el compuesto orgánico presenta una carga total positiva. En otra forma de realización preferente, el compuesto orgánico no presenta carga negativa. En una forma de realización preferente, en el caso del compuesto orgánico se trata de un ácido ω -aminocarboxílico.

20 En una forma de realización preferente, el concepto "presenta una carga", como se emplea en este caso, significa que un compuesto especificado de este modo presenta una carga correspondiente en disolución acuosa a pH 0 a 14, preferentemente 2 a 12, 2 bis 6, 8 a 12, 3 a 10, 6 a 8, del modo más preferente a pH 7. En otra forma de realización preferente, el concepto "presenta una carga", como se emplea en este caso, significa que el correspondiente grupo funcional o compuesto a pH 7 se presenta con la correspondiente carga, es decir, al menos en un 50, preferentemente un 90, de modo aún más preferente un 99 %.

25 En una forma preferente de realización de la invención, el concepto "contiene" se debe entender en el sentido de "comprende", es decir, de modo no concluyente. Una mezcla que contiene A en este sentido, puede presentar otros componentes además de A. La formulación "una o varias cargas" significa al menos una carga de la correspondiente naturaleza. Según la presente invención, bajo el concepto "hidrófobo", como se emplea en este caso, se entiende la propiedad de un líquido de formar una fase líquida propia, claramente separada de la fase acuosa, en presencia de una fase acuosa. En el caso de esta última se puede tratar de una fase cohesiva líquida o de una emulsión. Según la presente invención, con el concepto "hidrófobo", como se emplea en este caso, se entiende la propiedad de un compuesto de no disolverse en agua esencialmente. Por último, el concepto, como se emplea en este caso, se entiende de tal manera que tal compuesto especificado presenta un valor P (J. Sangster, Octanol-Water Partition Coefficients: Fundamentals and Physical Chemistry, Vol. 2 of Wiley Series in Solution Chemistry, John Wiley & Sons, Chichester, 1997), cuyo logaritmo decimal es mayor que 0, preferentemente mayor que 0,5, de modo aún más preferente mayor que 1, y en el más preferente de los casos mayor que 2.

35 Según la presente invención, el intercambiador iónico líquido no presenta acción tóxica, o presenta solo una acción tóxica moderada sobre microorganismos relevantes desde el punto de vista biotecnológico. En una forma preferente de realización de la invención, bajo el concepto "acción tóxica", como se emplea en este caso, se entiende la propiedad de un compuesto, en contacto con los correspondientes microorganismos, de reducir su velocidad de crecimiento, así como su actividad metabólica, aumentar su consumo de energía, reducir su densidad óptica o su número de células aptas para crecimiento, y/o conducir directamente a su muerte y lisis. En una forma de realización preferente, una de estas acciones en el caso de un compuesto tóxico se obtienen ya en concentración reducida, preferentemente a una concentración de 1000, preferentemente 100, de modo aún más preferente 50 o 25, del modo más preferente 5 mg/L. El especialista conoce numerosos procedimientos aplicables de manera rutinaria, por medio de los cuales se puede investigar la toxicidad. Entre éstos cuentan, a modo de ejemplo, la medida de la respiración de microorganismos correspondientes a través de electrodos de O₂ o el cultivo comparativo de muestras de microorganismos y el subsiguiente recuento de unidades que forman colonias (cfus). En una forma de realización preferente, bajo el concepto de una "acción tóxica moderada" se entiende que los microorganismos que se encuentran en una fase de crecimiento continúan creciendo y/o son metabólicamente activos en presencia del compuesto, pero en menor medida que en el caso de un control que se incubaba bajo las mismas condiciones en ausencia del correspondiente compuesto, y/o presentan una fase Lag prolongada.

La puesta en contacto de disolución acuosa y orgánica tiene lugar bajo condiciones apropiadas, y en especial durante un intervalo de tiempo que es suficiente para un paso suficiente de compuesto orgánico de la fase acuosa a la fase orgánica, idealmente incluso para el ajuste del correspondiente equilibrio. El especialista puede determinar esta duración y estas condiciones en el ámbito de la experimentación rutinaria.

5 En una forma de realización especialmente preferente, en el caso del compuesto orgánico que presenta una o varias cargas positivas se trata de un ácido graso aminado en posición terminal, de modo especialmente preferente ácido 12-aminoláurico, o un éster del mismo, o una mezcla de ambos compuestos. El especialista identificará que un éster de un ácido graso en presencia de un sistema biológico, que comprende actividades de esterasa, se puede presentar parcialmente en forma del correspondiente ácido, y ambos compuestos en este contexto se deben considerar equivalentes. Por consiguiente, en una forma de realización especialmente preferente, como se emplea en este caso, ácidos grasos o derivados de ácidos grasos comprenden también los correspondientes ésteres, preferentemente éster metílico, y viceversa.

10 Según la presente invención, en el caso del concepto "grupo alquileo", como se emplea en este caso, se trata de un grupo de la fórmula $-(CH_2)_n-$, es decir, de un alcano con dos sustituyentes descubiertos, preferentemente terminales. En el caso de los dos sustituyentes se puede tratar, por ejemplo, de un grupo amina y un grupo carboxi. Según la presente invención, n asciende al menos a 3, de modo aún más preferente al menos a 6, aún más preferentemente a 11. En el caso de una "cadena de alquileo substituida", al menos un átomo de hidrógeno está substituido por sustituyentes diferentes a un átomo de hidrógeno o un resto alquilo, preferentemente un átomo diferente a un átomo de hidrógeno. Por el contrario, según la presente invención, el concepto "grupo alquileo no substituido", como se emplea en este caso, significa una cadena de hidrocarburo de la fórmula $-(CH_2)_n-$ sin un substituyente de tal naturaleza.

20 La temperatura en el paso b) depende no solo de las propiedades del intercambiador catiónico líquido, sino también de los requisitos de temperatura de reacciones eventuales, que tienen lugar en la fase acuosa, en especial para el caso de que la puesta en contacto de la disolución acuosa y la disolución orgánica tenga lugar en la reacción que se desarrolla en la fase acuosa. En especial para el caso de que un agente biológico, como una célula viva, sea catalíticamente activa en la fase acuosa, la temperatura debe ser apropiada para el mantenimiento de esta actividad. En una forma de realización preferente, la temperatura en el paso b) asciende a 0 hasta 100 °C, preferentemente 20 a 80 °C, 28 a 70 °C, 30 a 37 °C, 35 a 40 °C.

25 También el valor de pH en el paso b) debe tener en cuenta los requisitos de reacciones eventuales que se desarrollan simultáneamente, la estabilidad de eductos, productos, productos intermedios o agentes. En una forma de realización preferente, el valor de pH asciende a 3 hasta 8, más preferentemente 6 a 8, de modo aún más preferente 6,2 a 7,2.

30 Para transferir lo más completamente posible el compuesto orgánico de la fase acuosa a la fase orgánica, es necesaria una cantidad suficiente de intercambiador catiónico líquido. En una forma preferente de realización de la presente invención, la proporción cuantitativa de sustancias de intercambiador catiónico líquido y compuesto orgánico en al menos un paso, en el caso de un proceso continuo en suma durante el desarrollo completo de la reacción, asciende al menos a 1, es decir, por molécula de compuesto orgánico se emplea al menos una molécula de intercambiador catiónico líquido. En una forma de realización aún más preferente, la proporción es mayor que 2, 3, 5, 10, 15, o 20, preferentemente 1,5 a 3.

35 La proporción volumétrica de disolución orgánica respecto a disolución acuosa, junto con la proporción cuantitativa de sustancias intercambiador catiónico/compuesto orgánico, es significativa para un procedimiento eficiente. En una forma de realización especial, ésta asciende a 100:1 hasta 1:100, preferentemente a 20:1 hasta 1:20, de modo aún más preferente 10:1 hasta 1:10, 4:1 hasta 1:4, 3:1 hasta 1:3, o del modo más preferente a 1:2 hasta 2:1.

40 Según la presente invención se emplea un ácido graso insaturado como intercambiador catiónico líquido. Según la presente invención, bajo el concepto "ácido graso", como se emplea en este caso, se entiende un ácido carboxílico, preferentemente un ácido alcanoico, con al menos 6, preferentemente 8, de modo aún más preferente 10, del modo más preferente 12 átomos de carbono. En una forma de realización preferente se trata de ácidos grasos de cadena lineal, en una forma de realización ulterior se trata de ácidos grasos ramificados. En otra forma de realización preferente se trata de un ácido graso de cadena lineal con al menos 12 átomos de carbono, que comprende un doble enlace, preferentemente en posición 9. En otra forma de realización preferente se trata de un ácido graso monoinsaturado, en el que el doble enlace se encuentra en la posición 9 y/o 11. En otra forma de realización preferente, en el caso de intercambiador catiónico líquido se trata de un ácido graso insaturado seleccionado a partir del grupo que comprende ácido oleico, ácido palmitoleico y ácido gadoleico y ácido icosénico.

50 En la forma de realización más preferente se trata de ácido oleico. En una forma de realización especialmente preferente se trata de un ácido graso con 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 átomos de carbono, preferentemente más de 12, de modo aún más preferente más de 14 átomos de carbono, de modo aún más preferente con 14 a 28, 14 a 22, del modo más preferente 16 a 18 átomos de carbono.

En otra forma de realización preferente se emplea como intercambiador iónico líquido una mezcla de diversos ácidos grasos, como se presenta, a modo de ejemplo, en forma de aceite de soja o aceite de cardo. En caso necesario, esto comprende una hidrólisis previa, si los ácidos grasos se presentan como éster.

5 En una forma especialmente preferente de realización de la presente invención se emplea una combinación de dos intercambiadores catiónicos líquidos, al menos uno de ellos un ácido graso. Una ventaja especial de la presente invención consiste en la compatibilidad del procedimiento según la invención con procedimientos biotecnológicos y agentes biológicos empleados en este caso. En una forma especial de realización de la presente invención, bajo el concepto "agente biológico con actividad catalítica", como se emplea en este caso, se entiende un biocatalizador sintetizado a través de una célula en todas las etapas de purificación, de la célula total a la molécula aislada. En una forma de realización preferente se trata de enzimas con actividad catalítica que exprimen una célula. En el caso de la célula se puede tratar de una procarionota, incluyendo arqueas, o de una eucariota, preferentemente del grupo que comprende *Pseudomonas*, *Corynebacterium* y *E. coli*. En una forma de realización aún más preferente, en el caso del agente se trata de una célula bacteriana, de modo aún más preferente una célula bacteriana gram-negativa, del modo más preferente *E. coli*. En otra forma de realización preferente se trata de una célula eucariota, preferentemente de una célula fúngica, de modo aún más preferente de una célula de levadura, del modo más preferente de *Saccharomyces* o *Candida*, *Pichia*, en especial *Candida tropicalis*. En esta solicitud, en una forma de realización especial, el concepto "célula" se emplea de modo equivalente e intercambiable con el concepto "microorganismo". Además, en el caso de la célula se puede tratar de una célula aislada o de una mezcla de cultivos.

20 La célula empleada como agente biológico puede ser viable, o se puede tratar de una preparación de la misma, a modo de ejemplo de una fracción de membrana o fracción citosólica, o un extracto crudo de la célula.

Si en el caso del agente biológico se trata de una molécula aislada en diversas etapas de purificación, se puede tratar de todas las moléculas catalíticamente activas, producidas por una célula. En una forma de realización especialmente preferente se trata de una molécula del grupo que comprende péptidos, polipéptidos, hidratos de carbono, ácidos nucleicos o formas mixtas de los mismos. En una forma de realización aún más preferente se trata de un polipéptido catalíticamente activo. En otra forma de realización preferente se trata de una molécula inmovilizada.

30 Las funciones catalíticas necesarias para el procedimiento sintético biotecnológico son múltiples. En una forma de realización preferente, en el caso del concepto "actividad catalítica", como se emplea en este caso, se trata de una actividad sintética, es decir, la catálisis de reacciones químicas que comprende la formación de al menos un nuevo enlace covalente. En otra forma de realización preferente se trata de una actividad de transporte, es decir, la capacidad de una molécula de provocar el transporte de otra molécula de un compartimento a otro, por ejemplo, la absorción de una sustancia del medio acuoso a través de una membrana celular al interior de la célula.

35 En una forma de realización especialmente preferente, en el caso del agente biológico se trata de una célula viva, que se emplea para la catálisis en presencia del intercambiador catiónico líquido, preferentemente para sintetizar un compuesto orgánico con una o varias cargas positivas, que se elimina a continuación o simultáneamente por medio del intercambiador catiónico líquido en una fase hidrófoba orgánica.

40 En una forma de realización especialmente preferente, la presencia del compuesto orgánico influye negativamente en la actividad catalítica. En una forma de realización, esto puede reducir la cantidad de actividad presente, expresable en el sentido de una menor k_{cat} de un enzima. En otra forma de realización, la afinidad del agente que presenta la actividad catalítica puede ser afectado en el sentido de un K_M elevado de un enzima. En otra forma de realización, la especificidad de la actividad catalítica puede ser modificada, a modo de ejemplo de modo que transforme preferentemente una molécula de sustrato diferente a la deseada, o preferentemente haga reaccionar la misma. En otra forma de realización, el compuesto orgánico presenta una acción tóxica sobre la célula como agente biológico.

En otra forma de realización, en el caso del compuesto orgánico se trata de un compuesto orgánico, que reduce la disponibilidad de un co-sustrato esencial o co-enzima esencial. Este puede ser el caso, por ejemplo, si el compuesto orgánico inhibe una reacción de regeneración correspondiente.

50 Además del intercambiador catiónico líquido, la fase hidrófoba orgánica puede contener además un disolvente hidrófobo. Esto puede servir para aumentar la capacidad de absorción de un intercambiador catiónico líquido en la fase hidrófoba, e impedir un comportamiento no deseado, a modo de ejemplo floculación. En una forma de realización preferente, en el caso del disolvente se trata de un educto en la reacción que se desarrolla en la disolución acuosa, del modo más preferente el sustrato de una reacción que se desarrolla en la disolución acuosa catalizada por vía enzimática. En una forma de realización preferente se trata de un éster de ácido graso. En una

forma de realización preferente, en el caso del disolvente se trata de un éster, preferentemente éster metílico de ácido graso, de un ácido graso que sirve como intercambiador catiónico.

5 La fracción de disolvente, en tanto esté presente, en la fase hidrófoba orgánica, asciende a un 1 hasta un 99 por ciento en volumen (% en volumen) en una forma de realización preferente. En una forma de realización preferente, la fracción de disolvente asciende a un 10 hasta un 90, de modo más preferente a un 20 hasta un 80, del modo más preferente a un 25 hasta un 75 % en volumen.

10 En la forma más preferente de realización del procedimiento, en el caso del compuesto orgánico se trata de ácido 12-aminoláurico y/o 12-aminolaurato de metilo, que se produce en la fase acuosa de una cepa de *E. Coli* recombinante mediante oxidación gradual del átomo de carbono terminal del laurato de metilo, como se da a conocer en el documento DE10200710060705, y la fase hidrófoba comprende un 25 a un 75 % de ácido oleico como intercambiador catiónico líquido disuelto en laurato de metilo como sustrato de la reacción.

15 La enseñanza de la presente invención se puede realizar no solo bajo empleo de secuencias exactas de aminoácido o ácido nucleico de las macromoléculas biológicas aquí descritas, sino también bajo empleo de tales macromoléculas, que se pueden obtener mediante delección, adición o sustitución de uno o más de un aminoácido o ácido nucleico. En una forma de realización preferente, el concepto "variante" de una secuencia de ácido nucleico o secuencia de aminoácido, a continuación empleado de modo equivalente e intercambiable con el concepto "homólogo", como se emplea en este caso, significa otra secuencia de ácido nucleico o aminoácido, que presenta una homología, en este caso empleada de modo equivalente a identidad, de un 70, 75, 80, 85, 90, 92, 94, 96, 98, 99 % o un mayor porcentaje respecto a la correspondiente secuencia de ácido nucleico o aminoácido de tipo salvaje original, estando mutados cromosómicamente o substituidos preferentemente aminoácidos diferentes a los que forman el centro catalíticamente activo o aminoácidos esenciales para la estructura o plegamiento, o estando substituidos estos últimos únicamente a modo de conservación, a modo de ejemplo un glutamato en lugar de un aspartato, o una leucina en lugar de una valina. El estado de la técnica describe algoritmos que se pueden emplear para calcular la medida de la homología de dos secuencias, por ejemplo Arthur Lesk (2008), Introduction to bioinformatics, 3ª edición. En otra forma más preferente de realización de la presente invención, la variante de una secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos, de modo preferente adicionalmente a la homología de secuencia citada con anterioridad, presenta esencialmente la misma actividad enzimática de la molécula de tipo salvaje, o bien de la molécula original. Por ejemplo, una variante de un polipéptido con actividad enzimática como proteasa presenta la misma, o esencialmente la misma actividad proteolítica que el enzima polipeptídico, es decir, la capacidad de catalizar la hidrólisis de un enlace peptídico. En una forma de realización especial, el concepto "esencialmente la misma actividad enzimática" significa una actividad respecto a los sustratos del polipéptido de tipo salvaje, que se sitúa claramente sobre la actividad básica y/o se diferencia en menos de 3, preferentemente 2, de modo aún más preferente en un orden de magnitud, de los valores K_M y/o k_{cat} , que presenta el polipéptido de tipo salvaje respecto a los mismos sustratos. En otra forma de realización preferente, el concepto "variante" de una secuencia de ácidos nucleicos o de aminoácidos comprende al menos una parte activa y/o fragmento de la secuencia de ácidos nucleicos, o bien aminoácidos. En otra forma de realización preferente, el concepto "parte activa", como se emplea en este caso, significa una secuencia de aminoácidos o una secuencia de ácidos nucleicos que presenta una longitud más reducida que la longitud total de la secuencia de aminoácidos, o bien codifica para una longitud menor que la longitud total de la secuencia de aminoácidos, presentando la secuencia de aminoácidos o la secuencia de aminoácidos codificante con menor longitud que la secuencia de aminoácidos de tipo salvaje, esencialmente la misma actividad enzimática que el polipéptido de tipo salvaje, o una variante del mismo, a modo de ejemplo que la alcohol dehidrogenasa, monooxigenasa o transaminasa. En una forma de realización especial, el concepto "variante" de un ácido nucleico significa un ácido nucleico cuya hebra complementaria, preferentemente bajo condiciones restrictivas, se une al ácido nucleico de tipo salvaje. La restricción de la reacción de hibridación es fácilmente determinable por el especialista, y depende generalmente de la longitud de la sonda, las temperaturas en el lavado y la concentración de sales. Sondas más largas requieren generalmente temperaturas más elevadas para la hibridación, mientras que muestras más cortas tienen suficiente con bajas temperaturas. Que tenga lugar una hibridación depende en general de la capacidad del ADN desnaturalizado de condensarse en hebras complementarias, que están presentes en su entorno, y precisamente por debajo de la temperatura de fusión. La restricción de la reacción de hibridación y condiciones correspondientes se describen más minuciosamente en Ausubel *et al.* 1995. En una forma de realización preferente, el concepto "variante" de un ácido nucleico, como se emplea en este caso, comprende una secuencia de ácido nucleico arbitraria, que codifica para la misma secuencia de aminoácidos que el ácido nucleico original, o una variante de esta secuencia de aminoácidos en el ámbito de la degenerabilidad del código genético.

55 En el estado de la técnica se describen polipéptidos apropiados, que se pueden emplear para la producción de compuestos orgánicos de la fórmula (I), en especial alcano monooxigenasas, AlkL, transaminasas, aldehído dehidrogenasas y alanina dehidrogenasas, a modo de ejemplo en el documento DE10200710060705, el documento EP11004029 o en el documento PCT/EP2011/053834.

En la forma de realización más preferente, en el caso de la alcano monooxigenasa se trata de una alcano monooxigenasa de tipo AlkB. AlkB representa una oxidorreductasa del sistema AlkBGT de *Pseudomonas putida*, que es conocida por su actividad de hidroxilasa. Ésta es dependiente de dos polipéptidos ulteriores, AlkG y AlkT. AlkT se caracteriza como rubredoxina-reductasa dependiente de FAD, que transmite electrones de NADH y AlkG.

5 En el caso de AlkG se trata de una rubredoxina, una proteína redox que contiene hierro, que actúa como donador de electrones directo para AlkB. En una forma de realización preferente, bajo el concepto "monooxigenasa de tipo alkB", como se emplea en este caso, se entiende una alcano monooxidasa en posición de membrana. En otra forma de realización, bajo el mismo concepto "monooxigenasa de tipo alkB" se entiende un polipéptido con una homología de secuencia de, en orden de preferencia creciente, al menos 75, 80, 85, 90, 92, 94, 96, 98 o 99 % respecto a la
10 secuencia de AlkB de *Pseudomonas putida* Gpo1 (código de banco de datos: CAB54050.1). En otra forma de realización preferente, bajo el concepto se entiende una monooxigenasa independiente de citocromo. En otra forma de realización preferente, bajo el concepto "alcano monooxigenasa de tipo alkB" 5 se entiende una monooxigenasa independiente de citocromo, que emplea al menos una rubredoxina o un homólogo como donador de electrones. En una forma de realización especialmente preferente, bajo el concepto una alcano monooxigenasa en posición de membrana, independiente de citocromo, con, en orden de preferencia creciente, al menos 60, 70, 80, 80, 85, 90, 92,
15 94, 96, 98 o 99 % respecto a la secuencia de AlkB de *Pseudomonas putida* Gpo 1, que requiere como donador de electrones al menos AlkG (CAB54052.1), pero preferentemente la combinación de AlkG con la reductasa AlkT (CAB54063.1), pudiéndose tratar en el caso de alK G y/o alK T también de un homólogo del respectivo polipéptido. El concepto "secuencia", como se emplea en este caso, se puede referir a la secuencia de aminoácidos de un polipéptido y/o la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la misma. En otra forma de realización preferente, en el caso de una "alcanomonooxigenasa de tipo alkB", como se emplea en este caso, se trata de una oxidorreductasa independiente de citocromo, es decir una oxidorreductasa que no comprende citocromo como cofactor.

La presente invención se ilustra además mediante las siguientes figuras y ejemplos no limitantes, cuyas características, formas de realización, aspectos y ventajas ulteriores se pueden extraer de la presente invención.

25 La fig. 1 muestra un experimento de control para la confirmación de que LSME no presenta acción tóxica, analizado con una cepa de *E. coli* W3110 y en comparación con tampón fosfato potásico (Kpi) como control negativo.

La fig. 2 muestra la viabilidad de la cepa de *E. coli* W3110 en forma del número de cfus que la cepa puede formar en ausencia de un intercambiador catiónico líquido y en presencia de diversos cambiadores catiónicos líquidos, después de 0 h, 4 h y 24 h.

30 La fig. 3 muestra el efecto del empleo de un intercambiador catiónico líquido sobre la toxicidad en base a la modificación del número de células vivas de una cepa de *E. coli*-W3110 en presencia de ALSME 0,2 %, DEHPA ajustado con amoniacó ("D2EHPNH3 2%"), o bien una mezcla de DEHPA/LSME (2 %/98 %) ("D/L") en presencia de ALSME 0,2%.

35 La fig. 4 muestra el efecto de diversos intercambiadores catiónicos líquidos sobre la OTR de la cepa que produce aminolaurato de metilo. El experimento se llevó a cabo como se describe en el ejemplo 4.

La fig. 5 muestra la influencia de diversos intercambiadores catiónicos líquidos sobre el rendimiento de aminolaurato de metilo, que produce una cepa de *E. Coli* con modificación genética apropiada. El experimento se llevó a cabo como se describe en el ejemplo 4.

40 Ejemplo 1: investigación de la toxicidad del disolvente LSME, que se emplea en composiciones con intercambiadores catiónicos líquidos.

Con este ensayo se mostró la toxicidad relativamente reducida de LSME respecto a microorganismos relevantes desde el punto de vista biotecnológico, que convierte LSME en un disolvente orgánico apropiado para el procedimiento según la invención.

45 Antes de poder llevar a cabo la determinación de CFU se cubrió una placa LB (10 g/L de peptona de caseína, 5 g/L de extracto de levadura, 10 g/L de NaCl) con *E. coli* BW3110 y se incubó durante 24 h. La tarde del día siguiente se inoculó un cultivo previo de esta placa cubierta con anterioridad. Este cultivo previo tenía un volumen de 50 mL de medio LB, y se incubó durante la noche aproximadamente 16 h. Al día siguiente se sobreinoculó el cultivo previo con una OD₆₀₀ de 0,2 en 200 mL de medio M9 (Na₂HPO₄ 6,79 g/L; KH₂PO₄ 3,0 g/L; NaCl 0,5 g/L; NH₄Cl 1g/L; 1 mL/L de disolución de oligoelementos, pH 7,4. Disolución de oligoelementos: HCl 37 % (=455,8 g/L) 36,50 g/L;
50 MnCl₂*7H₂O 1,91 g/L; ZnSO₄*7H₂O 1,87 g/L; Na-EDTA*2H₂O (Titriplex III) 0,84 g/L; H₃BO₃ 0,30 g/L; Na₂MoO₄*2H₂O 0,25 g/L; CaCl₂*2H₂O 4,70 g/L; FeSO₄*7H₂O 17,80 g/L; CuCl₂*2H₂O 0,15 g/L) con un 3 % de glucosa (w/v) y se incubó durante aproximadamente 20 h. Tras la incubación del cultivo principal se cosecharon las células, se centrifugaron con 5258 g y a 4°C durante 10 min, y se resuspendieron con una OD₆₀₀ de 30 en 10 mL de

- 5 tampón K_p; 50 mM a pH 7,4 (o tampón HEPES 25mM pH 7,4, si se llevaron a cabo determinaciones de CFU con ALSME). Ambas disoluciones tampón empleadas contenían un 5 % de glucosa (w/v). A continuación se trasladó la suspensión de bacterias al matraz vibratorio y se mezcló con las respectivas disoluciones de substancia. Una vez efectuado el entremezclado mediante agitación del matraz se pipetearon 100 µL de la suspensión y se cargaron en 900 µL de disolución salina estéril dispuesta. Esto correspondía a la toma de muestra en el momento t₀. Siguió la incubación de las cargas a 250 rpm y 30°C. Los CFUs se determinaron durante un intervalo de tiempo de 22 h. Las tomas de muestra tuvieron lugar en primer lugar en los momentos t₀, t₃, t₆ y t₂₂. En algunas cargas se añadió un momento de toma de muestras ulterior t_{1,5} y además se cultivó una serie de dilución adicional, para minimizar desviaciones.
- 10 La OD₆₀₀ se situaba en 60. Las células se resuspendieron en 10 mL de tampón K_p y a continuación se mezclaron en el matraz con 5 mL de LSME 98 % (w/w). Se cultivó en placa una etapa de dilución por carga. El número de CFU/mL permaneció constante durante el intervalo de tiempo de 6 h. Después de 22 h se pudo registrar un retroceso porcentual del número de células vivas de únicamente un 30,3 %.
- 15 Ejemplo 2: ensayos comparativos de toxicidad de diversos intercambiadores catiónicos líquidos frente a microorganismos relevantes desde el punto de vista biotecnológico
- Este ejemplo muestra una menor toxicidad de ácidos grasos no ramificados frente a otros intercambiadores catiónicos líquidos, como DEHPA, así como ácidos grasos saturados ramificados y no ramificados.
- 20 En primer lugar se inoculó un cultivo previo que comprendía 20 ml de medio LB en un matraz con deflectores de 100 ml con un criocultivo de la correspondiente cepa. El cultivo se cultivó durante la noche a 37°C y agitación a 200 rpm, y se empleó al día siguiente para inocular el mismo cultivo principal a una OD de 0,2. Los cultivos principales (en cada caso 30 mL de medio LB) se incubó a continuación bajo las mismas condiciones. En el caso de una OD de 0,4 a 0,5 se cubrió el cultivo principal respectivamente con volúmenes iguales (30 ml) de disolvente, y a continuación se incubó ulteriormente.
- 25 Para la determinación del número de cfu (colony-forming units o unidades que forman colonias) se extrajeron en los siguientes ensayos muestras de 0,1 ml y se diluyeron las mismas en disolución estéril de NaCl al 0,9 %. Se cultivaron etapas de dilución apropiadas en placas de LB-agar. Tras incubación a 34°C durante la noche se contaron las colonias formadas y se determinaron los cfus.
- 30 Ensayo 1: comparación de la toxicidad entre DE2HPA y un ácido graso saturado como intercambiador catiónico líquido
- 35 Se pusieron en contacto un 50 % de DEHPA, o bien ácido láurico (15 %), respectivamente disueltos en LSME y cargados con ALSME equimolarmente, o bien al 25 % en moles, como intercambiador catiónico líquido con una cepa de *E. coli* BL21 (DE3), y se analizó la influencia de ambos compuestos sobre la capacidad de formar colonias de la cepa, expresada en cfus. En ensayos previos se pudo mostrar que el laurato de metilo – que no puede actuar como intercambiador catiónico líquido debido a la carga deficiente – es convenientemente compatible con las cepas empleadas.

Tabla 1:

Ensayo N°	Cepa de <i>E. coli</i> empleada	Intercambiador catiónico líquido empleado	Número de cfus después de 22, o bien 24 h respecto a t = 0 h
1a	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Ninguno	244 %
1b	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	DEHPA	0 %
1c	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Ácido láurico	1,2 %

- 40 Se muestra que ambos intercambiadores catiónicos reducen claramente el número de cfus, aunque en el caso de empleo de ácido láurico, en contrapartida a DEHPA, aún están presentes células viables y, por lo tanto, el ácido graso saturado es preferente como intercambiador catiónico líquido.

Ensayo 2: comparación de la toxicidad entre ácidos grasos ramificados saturados y diversas cantidades de ácido oleico como intercambiador catiónico líquido

En este caso se emplearon dos concentraciones de ácido oleico diferentes, y se adaptó el volumen mediante adición de la correspondiente cantidad de LSME (laurato de metilo).

5 Tabla 2:

Ensayo N°	Cepa de E. coli empleada	Intercambiador catiónico líquido empleado	Número de cfus después de 22, o bien 24 h respecto a t = 0 h
2a	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Ácido isononanoico	0
2b	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Ácido 2-etilhexanoico	0
2c	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	LSME/25% de ácido oleico	11 %
2d	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	LSME/75% de ácido oleico	18 %
2e	<i>E. coli</i> W3110	Ácido isononanoico	0
2f	<i>E. coli</i> W3110	Ácido 2-etilhexanoico	0
2g	<i>E. coli</i> W3110	LSME/25% de ácido oleico	29 %
2h	<i>E. coli</i> W3110	LSME/75% de ácido oleico	17 %

Se muestra que el número de células viables en el caso de empleo del ácido graso insaturado ácido oleico junto con LSME es claramente superior que en el caso de empleo de ácidos grasos ramificados saturados.

10 Ensayo 3: comparación de la toxicidad entre ácidos grasos no ramificados saturados y ácidos grasos insaturados como intercambiador catiónico líquido

15 En este caso se compararon diversas cantidades de un ácido graso insaturado con un ácido graso saturado respecto a su toxicidad en el caso de empleo como intercambiador catiónico líquido. Debido a la menor solubilidad del ácido graso ácido láurico, éste se empleo en menor cantidad. Los volúmenes de los diversos intercambiadores catiónicos se ajustaron con LSME. El número de cfus se determinó al comienzo, después de 4,5 y después de 24 h.

Como se puede desprender de la fig. 2, la adición de ácido graso saturado como intercambiador catiónico líquido, incluso en menor concentración que la del ácido graso insaturado, ocasiona un descenso de cfus, mientras que, en el caso de ácido graso insaturado, se puede verificar un aumento de cfus.

20 En total se muestra un descenso de la toxicidad en los diversos intercambiadores catiónicos líquidos investigados en el siguiente orden: DEHPA > ácidos grasos saturados > ácidos grasos insaturados.

Ejemplo 3: reducción de la toxicidad de un compuesto orgánico con carga positiva mediante puesta en contacto con un intercambiador catiónico líquido

25 Este ensayo muestra que, mediante la presencia de un intercambiador catiónico líquido, se puede reducir la acción tóxica de un compuesto orgánico de carga positiva en una fase acuosa, en cuyo caso se trata de caldo de fermentación, extrayéndose este compuesto en la fase orgánica.

El procedimiento experimental fundamental correspondía al del ejemplo 1.

5 Ya que ALSME 0,2 % (w/v), sistemas acuosos, presentaba acción bactericida, este ensayo se llevó a cabo en combinación con D2EHPNH3/LSME 2/98 % (w/w) de nuevo en el matraz vibratorio, en este caso D2EHPNH3 significa D2EHPA cargado cuantitativamente con amonio. Mediante el empleo del intercambiador iónico líquido se mejora la transición de ALSME a la fase orgánica, mediante lo cual se reduce su concentración en la fase acuosa, en la que se encuentran también las células. Para reducir una acción tóxica debida a D2EHPA se emplearon concentraciones reducidas de 2 % (w/w) de D2EHPNH3.

10 Las bacterias se resuspendieron en primer lugar en 5 mL (correspondientemente a la mitad del volumen de tampón). En caso dado se mezclaron otros 5 mL de tampón con 0,4 % (w/v) de ALSME, y a continuación se sometieron a vórtice, en caso dado con 5 mL de D2EHPNH3/LSME 2/98 % (w/w) 1 min a 3000 Upm. Esta disolución se añadió a la suspensión de bacterias dispuesta en el matraz vibratorio y se mezcló. Después se efectuó la primera toma de muestra.

15 La disolución tenía una consistencia espumosa al comienzo de los ensayos, que había desaparecido, no obstante, en la 2ª toma de muestra en ambos ensayos. La abreviatura "D/L" se empleó para D2EHPNH3 (D2EHPA cargado con amoniaco)/LSME 2/98 % (w/w). Entre las tomas de muestra t_0 y $t_{1,5}$ h aumentó el número de CFU/mL en un 34,3 %. De la toma de muestra ($t_{1,5}$) hasta la última toma de muestra (t_{22}) se redujo el número de CFU/mL en un 54,9 %. En comparación con la carga con D2EHPNH3/LSME 2/98 % (w/w) sin adición de ALSME 0,2 % (w/v), el número de células aptas para propagación después de 22 h era 4,5 veces más elevado y con un 3,4 % no significativamente menor que el valor medio de las cargas de control en tampón HEPES (véase la fig. 4). En comparación con la carga con ALSME 0,2 % (w/v) en el matraz vibratorio, sin adición de una fase orgánica, el número de CFU/mL era 2800 veces más elevado.

Se muestra que la presencia de intercambiador catiónico líquido reduce la toxicidad del compuesto cargado positivamente, en este caso determinada mediante el número de cfus remanentes.

25 Ejemplo 4: ensayos comparativos de toxicidad de diversos intercambiadores catiónicos líquidos frente a un microorganismo que produce ácido ω -aminoláurico (ALS) y el éster metílico (ALSME)

La biotransformación de laurato de metilo en aminolaurato se sometió a ensayo en sistema de fermentación paralela 8 veces mayor de DasGip con diversos cambiadores iónicos.

30 Para la fermentación se emplearon reactores de 1L. Las sondas de pH se calibraron por medio de un calibrado de dos puntos con disoluciones de medida de de pH 4,0 y pH 7,0. Los reactores se cargaron con 300 mL de agua potable y se trataron en autoclave 20 min a 121°C para garantizar la esterilidad. A continuación, las sondas de pO2 se polarizaron durante la noche (al menos durante 6 h). A la mañana siguiente se extrajo el agua bajo la vitrina y se substituyó por medio de alta densidad celular con 50 mg/L de canamicina y 34 mg/L de cloroanfenicol. A continuación se calibraron las sondas de pO2 con una calibración de un punto (agitador: 600 rpm/gasificación 10 sL/h de aire), y se purificaron los tramos medios de alimentación, agente de corrección e inducción por medio de limpieza en sitio. A tal efecto se lavaron los tubos flexibles con un 70 % de etanol, a continuación con NaOH 1 M, después con agua VE estéril, y en último lugar se cargaron con el respectivo medio.

40 La cepa de *E. Coli* productora de ALS y ALSME BL21 (DE3) T1r pBT10 pACYC:Duet[TAcv] se cultivó en primer lugar desde el criocultivo en medio LB (25 mL en un matraz con deflectores de 100 mL) con 50 mg/L de canamicina y 34 mg/L de cloroanfenicol durante la noche a 37°C y 200 rpm durante aproximadamente 18 h. A continuación se sobreinocularon respectivamente 2 mL de los cultivos en medio de alta densidad celular (glucosa 15 g/L (30 mL / L de una disolución madre tratada en autoclave por separado de 500 g/L con un 1 % de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ y un 2,2 % de NH_4Cl), $(NH_4)_2SO_4$ 1,76 g/L, K_2HPO_4 19,08 g/L, KH_2PO_4 12,5 g/L, extracto de levadura 6,66 g/L, citrato trisódico dihidrato 11,2 g, disolución de citrato de hierro amónico 17 mL/L de una disolución madre al 1 % tratada en autoclave por separado, disolución de oligoelementos 5 mL/L de disolución madre tratada en autoclave por separado

45 $(HCl$ (37 %) 36,50 g/L, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 1,91 g/L, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 1,87 g/L, ácido etilendiaminotetraacético dihidrato 0,84 g/L, H_3BO_3 0,30 g/L, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 0,25 g/L, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 4,70 g/L, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 17,80 g/L, $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ 0,15 g/L)) (tres veces respectivamente 25mL en un matraz con deflectores de 100 mL) con 50 mg/L de canamicina y 34 mg/L de cloroanfenicol, y se incubaron a 37°C / 200 rpm durante 6 h más.

50 Los 3 cultivos se reunieron en un matraz vibratorio y se determinó la densidad óptica con 7,2. Para inocular los reactores con una densidad óptica de 0,1 se extrajeron en cada caso 4,2 mL en una jeringa de 5 mL, y se inocularon los reactores por medio de una cánula a través de un séptum.

Se empleó el siguiente programa estándar:

ES 2 642 237 T3

Regulador de DO		Regulador de pH	
Preset	0%	Preset	0 ml/h
P	0,1	P	5
Ti	300 s	Ti	200 s
Min	0%	Min	0 mL/h
Max	100%	Max	40 mL/h

N (rotación)	de	a	XO2 (mezcla gaseosa)	de	a	F (flujo de gas)	de	a
	0%	30%		0%	100%		15%	80%
Crecimiento biotransformación y	400 rpm	1500 rpm	Crecimiento biotransformación y	21%	21%	Crecimiento biotransformación y	6 sL/h	72 sL/h

Secuencia	
Desencadenante fuerte	31% DO (1/60h)
Inducción IPTG	2 h tras comienzo de alimentación
Desencadenante de alimentación	50% DO
Tasa de alimentación	3 [mL/h]

- 5 El experimento llevado a cabo se puede dividir en dos fases, el cultivo, en el que las células deben alcanzar una determinada densidad óptica, y la subsiguiente biotransformación, en la que se indujo la expresión de los genes necesarios para el procedimiento biotecnológico para la producción de ALSME. Los valores de pH se regularon parcialmente con amoníaco (12,5 %) a pH 6,8. Durante el cultivo y la biotransformación se reguló el oxígeno disuelto (DO, dissolved oxygen) en el cultivo en un 30 % a través del índice de revoluciones del agitador y la tasa de gasificación. La fermentación se llevó a cabo como carga de alimentación, desencadenándose el inicio de la alimentación, 5 g/Lh de alimentación de glucosa (500 g/L de glucosa con un 1 % de MgSO₄*7H₂O y un 2,2% de NH₄Cl), a través de un pico de DO. Con el inicio de la alimentación se redujo también la temperatura de 37°C
- 10 previamente a 30°C. La expresión de la transaminasa, de la alanina dehidrogenasa y de la reductasa de ácido graso se indujo 2 h después del comienzo de la alimentación mediante la adición automática de IPTG (1 mM). la inducción de los genes alk se efectuó mediante la adición manual de DCPK (0,025 % v/v) 10 h después del inicio de la alimentación. Antes del inicio de la biotransformación se determinó la densidad óptica de los caldos de cultivo.
- 15 El inicio de la fase de biotransformación se efectuó 14 h después del comienzo de la alimentación. A tal efecto se añadieron 150 mL de una mezcla de laurato de metilo y el respectivo cambiador iónico (10 % w/w) como carga al caldo de fermentación. Como intercambiador iónico se emplearon ácido di-(2-etilhexil)-fosfórico (DEHPA), ácido

- 5 láurico, ácido oleico, ácido palmítico, ácido palmitoleico, ácido esteárico, y una mezcla de ácidos grasos libres de la saponificación de aceite de cardo. Para disponer un donador de grupos amino para la transaminasa, junto con la adición de la fase orgánica se añadieron 10,7 mL de una disolución de alanina (125 g/L) al caldo de fermentación. Para la toma de muestras se extrajeron de la caldera 2 mL de caldo de fermentación, y una parte de éstos se diluyeron 1/20 en una mezcla de acetona-HCl (c(HCl) = 0,1 mol/L) y se extrajeron. Se tomaron muestras de todos los 8 reactores 1,25 h, 3 h, 5 h, 20 h, 22 h y 25 h tras el inicio de la biotransformación. Las tasas de conversión para oxígeno (OTR = oxygen transfer rate) y carbono (CTR = carbon transfer rate) durante la fermentación se determinaron a través de la analítica de gas de escape en los sistemas DasGip. La fermentación se concluyó 22 h después del inicio de la biotransformación.
- 10 La cuantificación de ALS, ALSME, DDS, DDSME, LS, LSME, HLS, HLSME, OLS y OLSME en muestras de fermentación se efectuó por medio de LC-ESI/MS² en base a un calibrado externo para todos los analitos y bajo empleo del patrón interno ácido aminoundecanoico (AUD).

En este caso se emplearon los siguientes aparatos:

- 15
- Instalación de HPLC 1260 (Agilent; Böblingen) con automuestreador (G1367E), bomba binaria (G1312B) y horno de columna (G1316A)
 - Espectrómetro de masas TripelQuad 6410 (Agilent; Böblingen) con fuente de ESI
 - Columna de HPLC: Kinetex C18, 100 x 2,1 mm, tamaño de partícula: 2,6 µm, tamaño de poro 100 Å (Phenomenex; Aschaffenburg)
- 20
- Columna previa: KrudKatcher Ultra HPLC de filtro en línea; profundidad de filtro 0,5 µm y 0,004 mm de diámetro interno (Phenomenex; Aschaffenburg)

25 Se prepararon las muestras pipeteándose 1900 µL de disolvente (mezcla de acetona/HCl 0,1 N = 1 : 1) y 100 µL de muestra en un recipiente de reacción de 2 mL. La mezcla se sometió a vórtice aproximadamente 10 segundos, y a continuación se centrifugó a aproximadamente 13000 rpm durante 5 min. El exceso claro se extrajo con una pipeta y se analizó tras dilución correspondiente con diluyente (80% (v/v) de ACN, 20% de H₂O bidest. (v/v), + 0.1% de ácido fórmico). Respectivamente a 900 µL de muestra se añadieron con la pipeta 100 µL de ISTD (10 µL con un volumen de muestra de 90 µL).

30 La separación por HPLC se efectuó con la columna, o bien columna previa citada anteriormente. El volumen de inyección ascendía a 0,7 µL, la temperatura de columna ascendía a 50°C, la tasa de flujo ascendía a 0,6 mL/min. La fase móvil estaba constituida por eluyente A (ácido fórmico acuoso al 0,1 % (v/v) y eluyente B (acetonitrilo con un 0,1 % (v/v) de ácido fórmico). Se utilizó el siguiente perfil de gradiente.

Tiempo [min]	Eluyente A [%]	Eluyente B [%]
0	77	23
0,3	77	23
0,4	40	60
2,5	40	60
2,6	2	98
5,5	2	98
5,6	77	23

ES 2 642 237 T3

Tiempo [min]	Eluyente A [%]	Eluyente B [%]
9	77	23

El análisis por ESI-MS² se efectuó en modo positivo con los siguientes parámetros de la fuente de ESI:

- Temperatura de gas 280°C
- Flujo de gas 11 L/min
- 5 • Presión de nebulizador 50 psi
- Tensión capilar 4000 V

La detección y cuantificación de los compuestos aislados se efectuó con los siguientes parámetros, utilizándose respectivamente un ion producto como *cualificador* y uno como *cuantificador*:

Analito	Ion precursor [m/z]	Ion producto [m/z]	Tiempo de residencia [ms]	Energía de colisión [eV]
DDSME	245,2	167,1	25	6
DDSME	245,2	149,1	50	8
HLSME	231,3	181,2	15	2
HLSME	231,3	163,2	25	5
DDS	231,2	213,2	50	0
DDS	231,2	149,1	25	9
ALSME	230,3	198,1	25	10
ALSME	230,3	163,2	15	10
OLSME	229,2	197,2	50	0
OLSME	229,2	161,1	25	5
HLS	217,2	181,2	35	0
HLS	217,2	163,1	20	4
OLS	215,2	161,2	25	0
OLS	215,2	95,2	60	13

Resultados:

5 Si se emplea DEHPA a modo de intercambiador catiónico como se describe en el estado de la técnica, se produce inmediatamente un descenso de la OTR inmediatamente tras adición del compuesto al cultivo. La curva desciende a 0 en un breve intervalo de tiempo, lo que indica que en el cultivo ya no hay presentes metabólicamente activas. Por lo tanto, DEHPA presenta una toxicidad de alto grado sobre las células.

10 Si se emplea ácido láurico como intercambiador catiónico líquido en lugar de DEHPA, se produce igualmente un descenso de la OTR, aunque éste no es tan intenso, y en el transcurso de las siguientes 22 h las células se recuperan y muestran una actividad metabólica creciente. Por consiguiente, ácido láurico es notablemente menos tóxico que DEHPA.

Se observan resultados aún más claros en el caso de empleo de ácidos saturados con cadenas de carbono más largas. Si se emplean ácido palmítico y esteárico, la curva de OTR desciende de modo claramente más superficial que en el caso de empleo de ácido láurico, o incluso DEHPA. De esto se puede concluir que estos ácidos grasos presentan una acción tóxica claramente menor.

15 El empleo de ácidos grasos insaturados, como ácido palmitoleico, aceite de cardo saponificado (que contiene predominantemente ácido linoleico) y ácido oleico, conduce sorprendentemente a resultados aún mejores. Estos ácidos grasos muestran sorprendentemente una toxicidad aún menor que los ácidos grasos saturados.

Citas bibliográficas:

20 J. Sangster, Octanol-Water Partition Coefficients: Fundamentals and Physical Chemistry, Vol. 2 of Wiley Series in Solution Chemistry, John Wiley & Sons, Chichester, 1997

Asano, Y., Fukuta, y., Yoshida, Y., and Komeda, H. (2008): The Screening, Characterisation, and Use of ω -Laurolactam Hydrolase: A New Enzymatic Synthesis of 12-Aminolauric Acid, Biosc. Biotechn. Biochem., 72 (8), 2141-2150

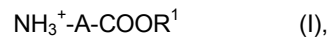
DE10200710060705 (2007): ω -Aminocarbonsäuren oder ihre Lactame, herstellende, rekombinante Zellen

25 F. M. Ausubel (1995), Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, Inc.

A. M. Lesk (2008), Introduction to Bioinformatics, 3rd Edition

REIVINDICACIONES

- 1.- Procedimiento para la eliminación de un compuesto orgánico a partir de una disolución acuosa, que comprende los pasos
- 5 a) Puesta a disposición de la disolución acuosa que contiene el compuesto orgánico y una disolución hidrófoba orgánica, que comprende un intercambiador catiónico líquido, siendo hidrófobo el intercambiador catiónico líquido,
 b) Puesta en contacto de la disolución acuosa y la disolución orgánica, y
 c) Separación de la disolución orgánica de la disolución acuosa,
- tratándose, en el caso del compuesto orgánico, de un compuesto de la fórmula I
- 10
$$\text{NH}_3^+-\text{A}-\text{COOR}^1 \quad (\text{I}),$$
- siendo R¹ hidrógeno, metilo, etilo o una carga negativa, y siendo A un grupo alquileo no sustituido, de cadena lineal, con al menos tres, preferentemente al menos ocho átomos de carbono,
- y tratándose de un ácido graso insaturado en el caso del intercambiador catiónico líquido.
- 15 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, ascendiendo la temperatura en el paso b) a 28 hasta 70, preferentemente a 30 hasta 37°C.
- 3.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 2, ascendiendo el valor de pH en el paso b) a 6 hasta 8, preferentemente a 6,2 hasta 7,2.
- 20 4.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, ascendiendo la proporción cuantitativa de sustancias de intercambiador catiónico líquido a compuesto orgánico al menos a 1.
- 5.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4, ascendiendo la proporción volumétrica de disolución orgánica respecto a disolución acuosa a 1 : 10 hasta 10 : 1.
- 6.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5, siendo el intercambiador catiónico líquido un ácido graso con más de 12, preferentemente con 14 a 22, de modo aún más preferente 16 a 18 átomos de carbono.
- 25 7.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 6, siendo el intercambiador catiónico líquido ácido oleico o ácido erúico.
- 8.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 7, comprendiendo la disolución acuosa además una célula.
- 9.- Procedimiento según la reivindicación 8, siendo la célula preferentemente una célula bacteriana, y presentando la célula de modo aún más preferente una alcano monooxigenasa recombinante, una transaminasa recombinante, así como, preferentemente, al menos un enzima del grupo que comprende una alcohol dehidrogenasa, una alanina dehidrogenasa, y el producto génico AlkL.
- 30 10.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 9, conteniendo además la disolución orgánica al menos un disolvente orgánico, preferentemente un ácido graso y/o un éster de ácido graso.
- 11.- Procedimiento según la reivindicación 10, comprendiendo la disolución orgánica como intercambiador catiónico líquido un 20 a un 80 % en volumen, preferentemente un 25 a un 75 % en volumen de ácido oleico, y como disolvente laurato de metilo, y tratándose, en el caso del compuesto orgánico, de 12-aminolaurato de metilo, y estando presente en la disolución acuosa una célula bacteriana, que presenta una alcano monooxigenasa recombinante, una transaminasa recombinante, así como, preferentemente, además al menos un enzima del grupo que comprende una alcohol dehidrogenasa, una alanina dehidrogenasa, y el producto génico AlkL.
- 40 12.- Mezcla de reacción que comprende una disolución acuosa y una disolución hidrófoba orgánica, comprendiendo la disolución hidrófoba orgánica un ácido graso insaturado, preferentemente un ácido graso con más de 12 átomos de carbono, como intercambiador catiónico líquido,
- y conteniendo la disolución acuosa un compuesto de la fórmula I



siendo R¹ hidrógeno, metilo, etilo o una carga negativa, y siendo A un grupo alquileo no sustituido, de cadena lineal, con al menos tres, preferentemente al menos ocho átomos de carbono.

- 5 13.- Mezcla de reacción según la reivindicación 12, comprendiendo la disolución acuosa además una célula, que presenta una alcano monooxigenasa recombinante, una transaminasa recombinante, así como preferentemente, además, al menos un enzima del grupo que comprende una alcohol dehidrogenasa, una alanina dehidrogenasa y el producto génico AKL.

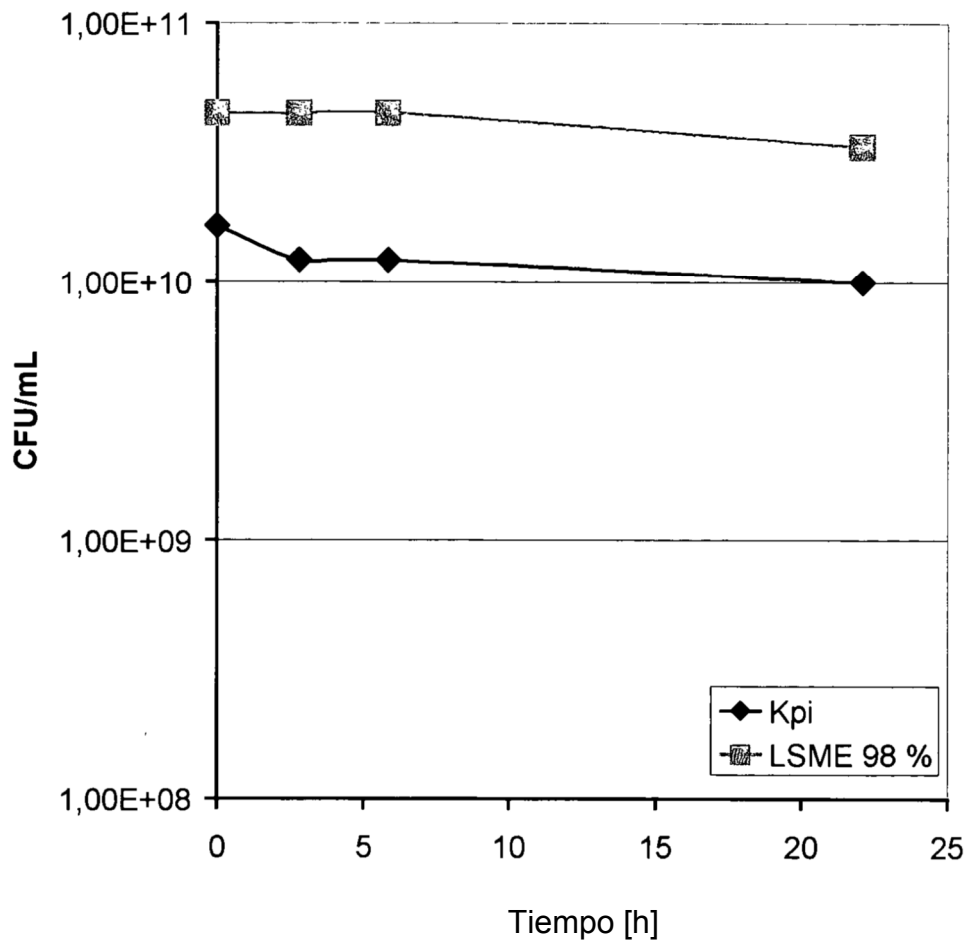


Figura 1

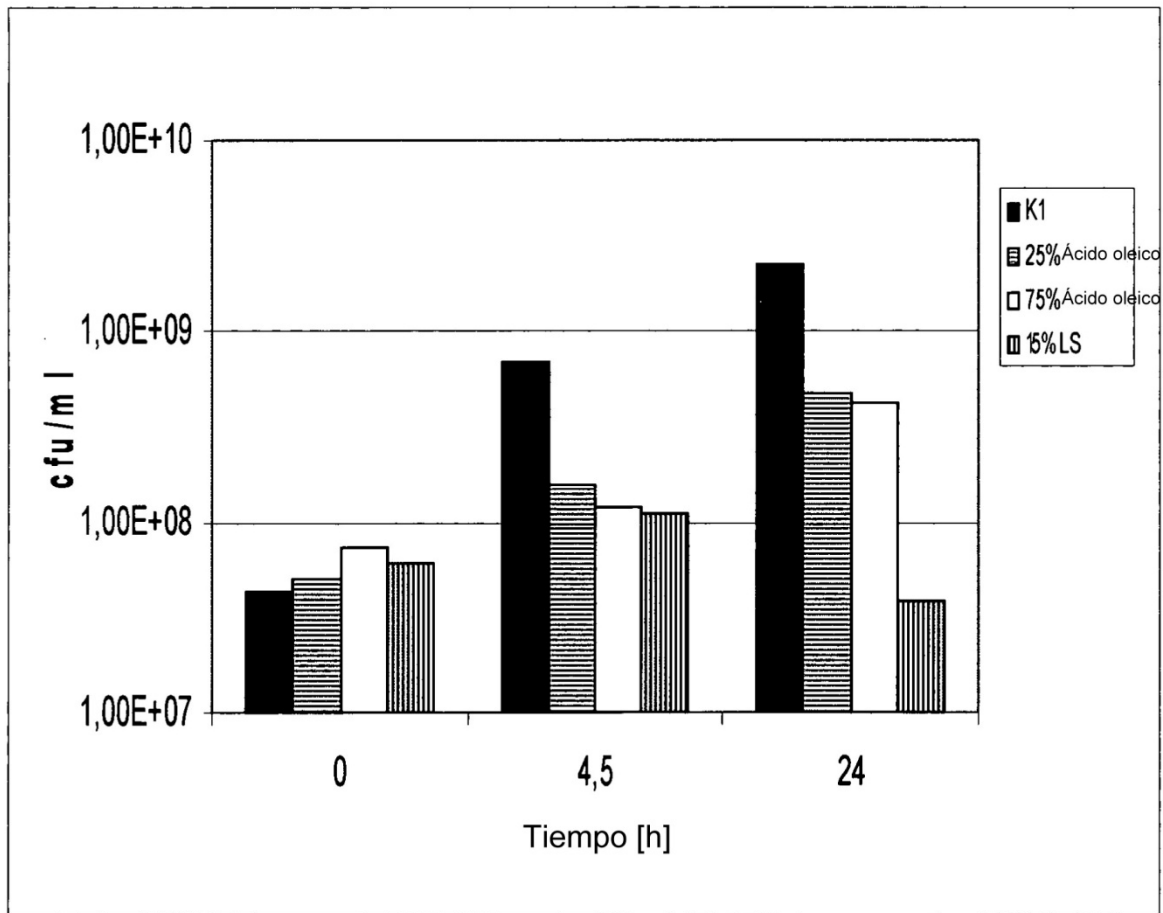


Figura 2

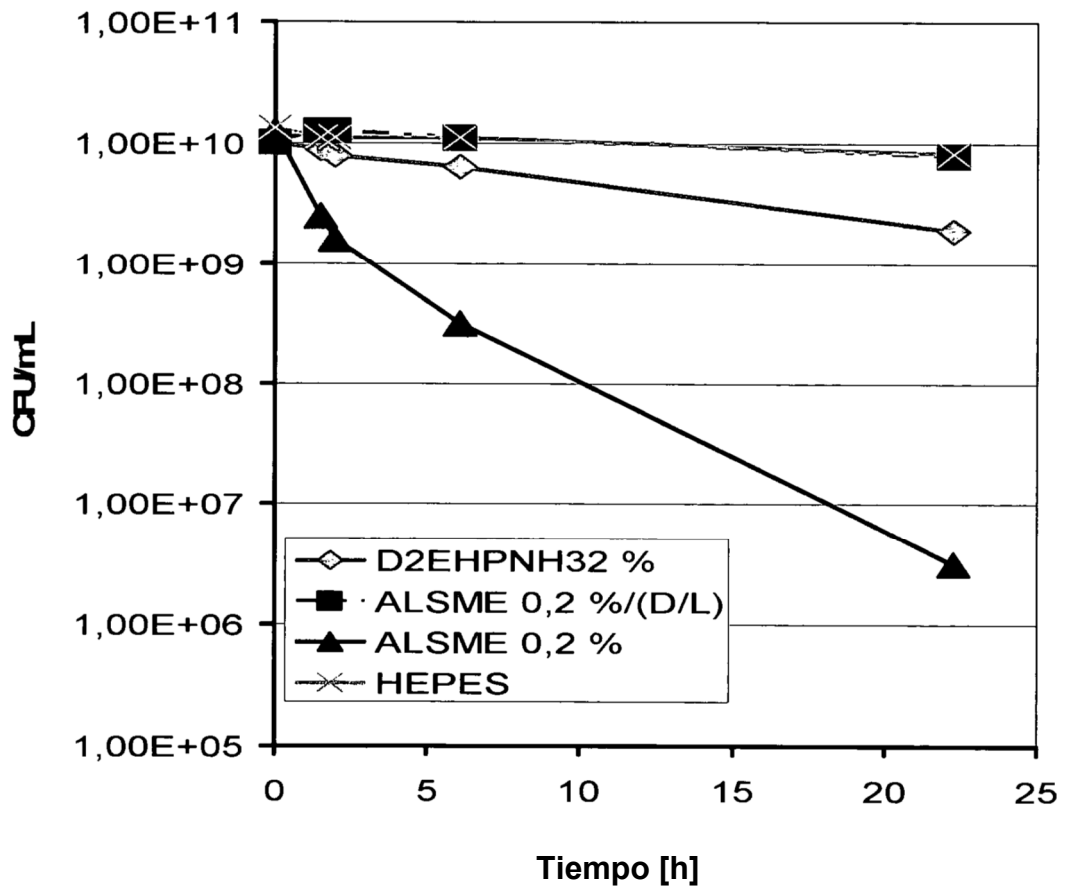
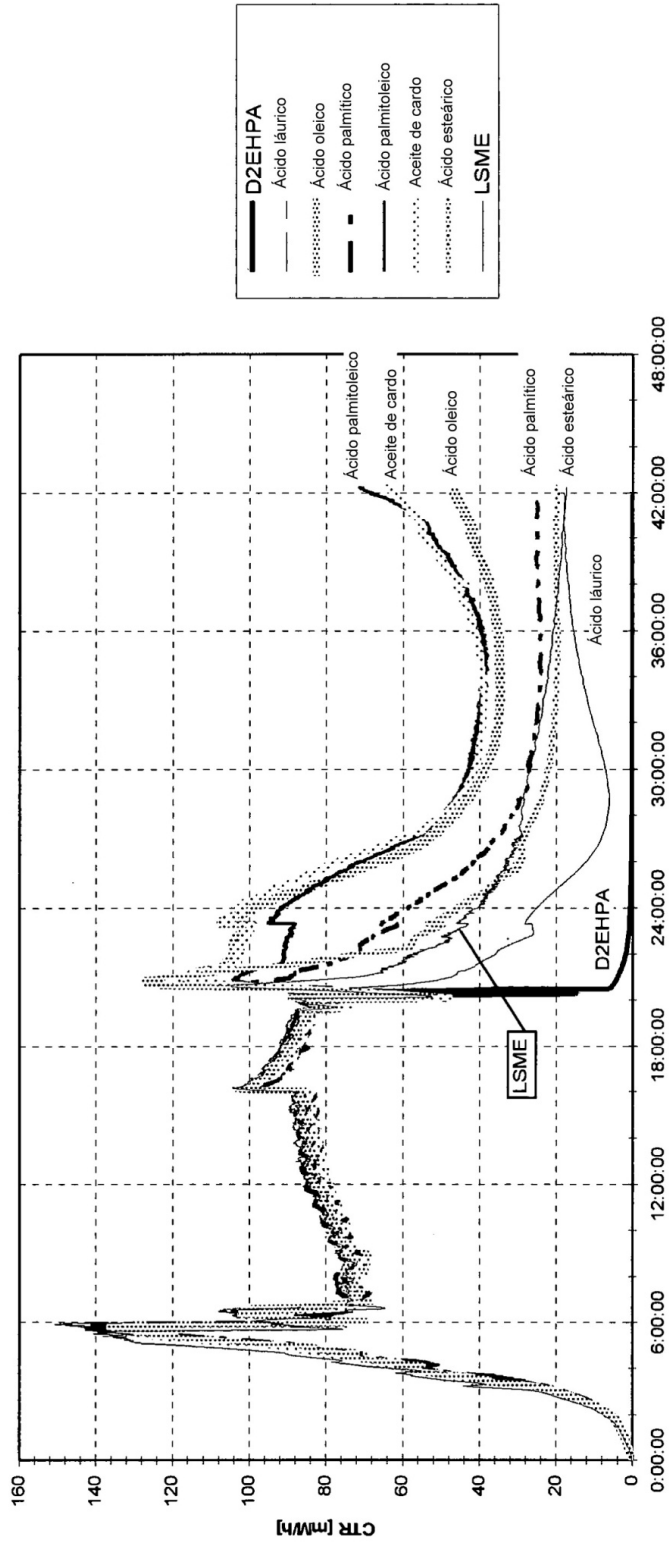


Figura 3



Tiempo [h]
Figura 4

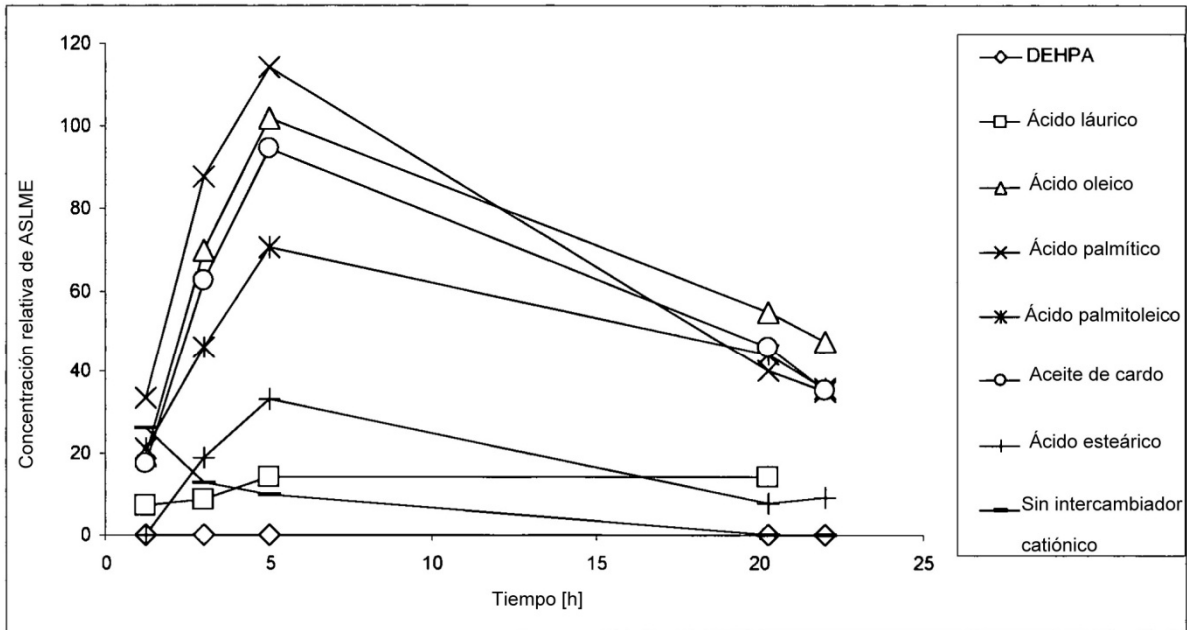


Figura 5