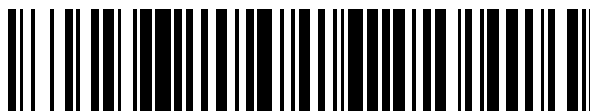


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 688 295**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/02** (2006.01)

**C12P 7/64** (2006.01)

**C12P 13/04** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.12.2012 PCT/EP2012/075889**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.06.2013 WO13092547**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.12.2012 E 12806038 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.08.2018 EP 2794898**

54 Título: **Procedimiento para la separación mejorada de una disolución hidrófoba orgánica de un medio de cultivo acuoso**

30 Prioridad:

**22.12.2011 EP 11195221**

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

**31.10.2018**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**HENNEMANN, HANS-GEORG;  
SCHAFFER, STEFFEN;  
WESSEL, MIRJA;  
HAAS, THOMAS;  
CORTHALS, JASMIN;  
BERSE, KATHARINA;  
HAFKEMEYER, SABINE;  
PÖTTER, MARKUS y  
ERHARDT, FRANK**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 688 295 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 separación mejorada de una disolución hidrófoba orgánica de un medio de cultivo acuoso

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para la separación mejorada de una disolución hidrófoba orgánica de un medio de cultivo acuoso, que comprende los pasos puesta a disposición de un medio de cultivo acuoso que contiene una célula metabólicamente activa, puesta en contacto del medio de cultivo acuoso con una disolución hidrófoba orgánica, separación de la disolución hidrófoba orgánica del medio de cultivo acuoso, presentando la célula una actividad, reducida frente a su tipo salvaje, de al menos una enzima que cataliza una de las reacciones de  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos. La invención se refiere además al empleo de una célula metabólicamente activa, que presenta una actividad, reducida frente a su tipo salvaje, de una enzima que cataliza una de las reacciones de  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos, seleccionada a partir del grupo que comprende FadL y FadE, así como variantes de las mismas, preferentemente FadE, para la separación mejorada de una disolución hidrófoba orgánica de un medio de cultivo acuoso que comprende la célula metabólicamente activa.

15 Un problema fundamental en procedimientos para la producción de productos químicos finos partiendo de materias primas regenerativas en lugar de combustibles fósiles, consiste en transformar en una fase hidrófoba orgánica el producto obtenido, que se presenta típicamente, en primer lugar, en una fase acuosa de gran volumen. Esta transformación es necesaria por una parte para concentrar un producto intermedio o final y para posibilitar, en caso dado, 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 marco razonable técnicamente, en especial si la presencia del producto, debido a una toxicidad frente a la cepa de producción o una inhibición de un biocatalizador relevante a través del producto, influye negativamente sobre el progreso de la reacción. Por regla general no es conveniente la concentración térmica directa del producto, presente frecuentemente en bajas concentraciones, a partir de la disolución acuosa de gran volumen.

25 Un ejemplo de tal producto, bastante solicitado industrialmente, que se produce convencionalmente partiendo de hidrocarburos contenidos en petróleo, es ácido 12-aminoláurico (ALS), o bien su éster metílico (ALSME). ALS es un importante producto de partida en la producción de polímeros, a modo de ejemplo para la producción de sistemas de conducción a base de nylon. Convencionalmente se produce ALS partiendo de combustibles fósiles en un proceso con bajo rendimiento a través de laurilactama, que se sintetiza mediante trimerización de butadieno, subsiguiente hidrogenación bajo formación de ciclododecano, subsiguiente oxidación para dar ciclododecanona, reacción con hidroxilamina, y subsiguiente transposición de Beckmann. Se describe una nueva vía más prometedora para la producción biotecnológica de ALS, o bien ALSME, en el documento WO 2009/077461. El procedimiento biotecnológico que motiva esta vía se puede llevar a cabo en un sistema bifásico bajo empleo de intercambiador iónico líquido, se describe en el documento EP11154707.

35 La elaboración de un producto a partir de una fase acuosa a través de una extracción en una fase hidrófoba orgánica presupone en primer lugar que este producto presenta una tendencia suficiente a presentarse en la fase orgánica en un sistema bifásico, que comprende una fase acuosa hidrófila y una fase orgánica hidrófoba, que no se mezclan, lo que depende decisivamente de las propiedades fisicoquímicas del respectivo compuesto. Mientras que los compuestos con una fracción elevada de hidrocarburos no substituidos, 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 de manera predominante, o prácticamente de manera exclusiva en la fase acuosa, lo que dificulta una transformación en una fase orgánica.

40 La distribución de un compuesto en 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

$$45 \quad \alpha = C_{\text{fase1}} / C_{\text{fase2}}.$$

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:

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

50 Otra condición para la elaboración del producto a partir de la fase hidrófoba consiste en que la distribución ha alcanzado el estado de equilibrio, que se describe mediante las ecuaciones citadas anteriormente, o al menos se aproxima suficientemente al mismo. El ajuste de equilibrio se determina, entre otros, mediante el tamaño de la superficie de contacto entre ambas fases, un factor que no es limitante generalmente en el caso de procedimientos biotecnológicos, ya que la superficie de contacto ha aumentado ya mediante medidas como la ventilación y la

agitación del medio de cultivo acuoso y la disolución hidrófoba orgánica, que son necesarias de por sí mediante el mantenimiento de altas densidades de células metabólicamente activas.

5 No obstante, antes de poder elaborar eficientemente tal mezcla de reacción, que se presenta en la disolución hidrófoba orgánica predominantemente en micelas u otros subcompartimentos, es necesaria una separación de ambas fases. Si la formación de dos fases en el mezclado de agua pura se efectúa con un disolvente orgánico hidrófobo puro de manera espontánea y sin otra intervención, la separación de una disolución orgánica hidrófoba a partir de un medio de cultivo complejo acuoso es menos sencilla debido a las múltiples interacciones posibles, y puede durar varias horas o incluso un día sin asistencia técnica, a modo de ejemplo mediante centrifugado.

10 En este contexto, para la producción a gran escala de compuestos químicos solicitados industrialmente a través de procesos biotecnológicos, es un factor de importancia decisiva el proceso de separación de fases en el desarrollo y en la aplicación de procedimientos para la producción con pocos recursos y rápida, y la elaboración de compuestos como ALS. Si el producto se debe extraer regularmente disuelto en una disolución hidrófoba orgánica a partir de una fase acuosa de gran volumen en un gran reactor, y elaborar a continuación, a demás de los parámetros relevantes para la verdadera producción, como tipo y cantidad de sustratos, temperatura y contenido en oxígeno del medio, también se debe optimizar la separación de la disolución hidrófoba para ahorrar recursos y hacer que el proceso total sea lo más ecológico posible. No en último término se debe mencionar que numerosos disolventes hidrófobos orgánicos empleados a escala industrial presentan una acción tóxica sobre organismos empleados biotecnológicamente al menos en el caso de un contacto más largo, y, también ante estos antecedentes para el cuidado de las cepas empleadas biotecnológicamente, y para impedir que los productos secundarios no deseados, liberados en la lisis de células, impurifiquen o incluso descompongan el producto objetivo, sería deseable acortar el contacto entre organismo en el medio de cultivo acuoso y disolvente.

25 Por lo tanto, la presente invención tomaba como base la tarea de poner a disposición un procedimiento para la obtención y la producción mejorada de productos generados por vía biotecnológica en un sistema bifásico, que comprende un medio de cultivo acuoso con una célula metabólicamente activa y una disolución hidrófoba orgánica. En especial se plantea la tarea de mejorar la separación de la disolución hidrófoba orgánica y la extracción de un producto soluble en la misma, generado biotecnológicamente, respecto a la rapidez del proceso, o bien la medida de la separación de la disolución hidrófoba orgánica del medio de cultivo acuoso en un intervalo de tiempo dado.

30 Otra tarea que motiva la presente invención consiste en poner a disposición una célula empleable biotecnológicamente con resistencia elevada frente a la toxicidad frente a tal célula, que parte de las disoluciones hidrofobas.

La presente invención tomaba además como base la tarea de poner a disposición un procedimiento biotecnológico para la producción de compuestos hidrófobos, en el que el consumo de oxígeno es reducido, y una célula apropiada a tal efecto.

35 Ésta y otras tareas se solucionan mediante el objeto de la presente solicitud, y en especial también mediante el objeto de las reivindicaciones independientes adjuntas, resultando formas de realización de las reivindicaciones subordinadas.

En un primer aspecto, la tarea que motiva la invención se soluciona mediante un procedimiento que comprende los pasos

- 40
- a) puesta a disposición de un medio de cultivo acuoso que comprende una célula metabólicamente activa,
  - b) puesta en contacto del medio de cultivo acuoso con una disolución hidrófoba orgánica,
  - c) separación de la disolución hidrófoba orgánica del medio de cultivo acuoso,

presentando la célula una actividad reducida frente a su tipo salvaje de al menos una enzima, que cataliza una de las reacciones de  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos,

presentando una alcano hidroxilasa recombinante de tipo alkB,

45 tratándose de una célula procariota en el caso de la célula,

siendo la reducción de la actividad un 90 o un mayor porcentaje de la actividad del tipo salvaje,

50 tratándose, en el caso de la enzima que cataliza una de las reacciones de  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos, de una enzima del grupo que comprende FadL y FadE, así como variantes de las mismas, preferentemente FadE o una variante de la misma, representando las variantes otra secuencia de ácidos nucleicos, que presenta una identidad de un 70 o un mayor porcentaje respecto a la correspondiente secuencia de ácido nucleico de tipo salvaje original, y presentando las variantes la misma actividad enzimática de la molécula de tipo salvaje, comprendiendo la disolución

orgánica al menos un disolvente del grupo que comprende alcanos, cicloalcanos, cicloalquenos, arilos, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, alcoholes, heterocicloalcanos, heterocicloalquenos y heteroarilos líquidos a temperatura ambiente, sustituidos y no sustituidos.

5 En una segunda forma de realización del primer aspecto, se trata de un procedimiento comprendiendo la disolución orgánica un ácido graso con más de 12 átomos de carbono o un éster del mismo, preferentemente ácido oleico, ácido erúxico o laurato de metilo.

10 En un segundo aspecto, la tarea que motiva la invención se soluciona mediante el empleo de una célula procariota metabólicamente activa, que presenta una actividad reducida frente a su tipo salvaje de al menos una enzima, que cataliza una de las reacciones de  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos, preferentemente de una enzima seleccionada a partir del grupo que comprende FadL y FadE, así como variantes de las mismas, preferentemente FadE, que presenta una alcano hidroxilasa recombinante de tipo alkB,

siendo la reducción de la actividad un 90 o un mayor porcentaje de la actividad de tipo salvaje,

tratándose, en el caso de la enzima que cataliza una de las reacciones de  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos, de una enzima del grupo FadL y FadE, o sus variantes de las mismas,

15 representando las variantes otra secuencia de ácidos nucleicos, que presenta una identidad de un 70 o un mayor porcentaje respecto a la correspondiente secuencia de ácido nucleico de tipo salvaje original, y presentando las variantes la misma actividad enzimática de la molécula de tipo salvaje,

para la mejora de la separación de una disolución hidrófoba orgánica de un medio de cultivo acuoso que comprende la célula metabólicamente activa,

20 comprendiendo la disolución orgánica al menos un disolvente del grupo que comprende alcanos, cicloalcanos, cicloalquenos, arilos, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, alcoholes, heterocicloalcanos, heterocicloalquenos y heteroarilos líquidos a temperatura ambiente, sustituidos y no sustituidos, para la mejora de la separación de una disolución hidrófoba orgánica de un medio de cultivo acuoso que comprende la célula metabólicamente activa, conteniendo la disolución orgánica al menos un disolvente del grupo que comprende alcanos, cicloalcanos, cicloalquenos, arilos, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, alcoholes, heterocicloalcanos, heterocicloalquenos y heteroarilos líquidos a temperatura ambiente, sustituidos y no sustituidos.

30 En un tercer aspecto, la tarea que motiva la invención se soluciona mediante el empleo de un Knock out de una enzima, que cataliza una de las reacciones de  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos, preferentemente una enzima seleccionada a partir del grupo que comprende FadE y FadL, así como variantes de las mismas, de modo aún más preferente FadE o una variante de la misma, representando las variantes otra secuencia de ácidos nucleicos, que presenta una identidad de un 70 o un mayor porcentaje respecto a la correspondiente secuencia de ácido nucleico de tipo salvaje original, y presentando las variantes la misma actividad enzimática de la molécula de tipo salvaje, como parte del equipamiento genético de una célula procariota metabólicamente activa de una alcano hidroxilasa recombinante de tipo alkB, para la mejora de la separación de una disolución hidrófoba orgánica de un medio de cultivo acuoso que comprende la célula metabólicamente activa, comprendiendo la disolución orgánica al menos un disolvente del grupo que contiene alcanos, cicloalcanos, cicloalquenos, arilos, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, alcoholes, heterocicloalcanos, heterocicloalquenos y heteroarilos líquidos a temperatura ambiente, sustituidos y no sustituidos.

40 En un cuarto aspecto, la tarea que motiva la invención se soluciona mediante una célula procariota, que presenta una actividad reducida frente a su tipo salvaje de una enzima que cataliza una de las reacciones de  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos, que comprende además una alcano hidroxilasa recombinante de tipo alkB,

45 siendo la reducción de la actividad un 90 o un mayor porcentaje de la actividad de tipo salvaje, tratándose, en el caso de la enzima que cataliza una de las reacciones de  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos, de una enzima del grupo que comprende FadL y FadE, así como variantes de las mismas, preferentemente FadE o una variante de la misma, representando las variantes otra secuencia de ácidos nucleicos, que presenta una identidad de un 70 o un mayor porcentaje respecto a la correspondiente secuencia de ácido nucleico de tipo salvaje original, y presentando las variantes la misma actividad enzimática de la molécula de tipo salvaje.

50 En un quinto aspecto, la tarea que motiva la invención se soluciona mediante una mezcla de reacción que comprende una disolución orgánica con una célula metabólicamente activa, según lo expuesto anteriormente, y una disolución hidrófoba orgánica,

comprendiendo la disolución hidrófoba orgánica al menos un disolvente del grupo que contiene alcanos, cicloalcanos, cicloalquenos, arilos, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, alcoholes, heterocicloalcanos, heterocicloalquenos y heteroarilos líquidos a temperatura ambiente, sustituidos y no sustituidos.

5 En una primera forma de realización del quinto aspecto, la tarea se soluciona mediante una mezcla de reacción, comprendiendo la disolución hidrófoba orgánica un ácido graso con más de 12 átomos de carbono o un éster del mismo, preferentemente ácido oleico, ácido erúxico o laurato de metilo.

10 En otra forma de realización del primer, segundo, tercer, cuarto o quinto aspecto, la tarea se soluciona mediante un procedimiento, un empleo o una mezcla de reacción, tratándose, en el caso de la célula metabólicamente activa, de una célula que presenta una alcano hidroxilasa recombinante y una transaminasa, preferentemente además al menos una enzima del grupo que comprende alcohol deshidrogenasa, alanina deshidrogenasa y lactama hidrolasa.

En otra forma de realización del primer, segundo, tercer, cuarto o quinto aspecto, la tarea se soluciona mediante un procedimiento, un empleo o una mezcla de reacción, tratándose, en el caso de la célula, de una célula procarionta, preferentemente *E. coli*.

15 En otra forma de realización del primer, segundo, tercer, cuarto o quinto aspecto, la tarea se soluciona mediante un procedimiento, un empleo o una mezcla de reacción, tratándose, en el caso de la célula, de una célula recombinante.

20 En otra forma de realización del primer, segundo, tercer, cuarto o quinto aspecto, la tarea se soluciona mediante un procedimiento, un empleo o una mezcla de reacción, constituyendo la disolución hidrófoba orgánica al menos un 5, preferentemente al menos un 20 por ciento del volumen total de disolución hidrófoba orgánica y medio de cultivo acuoso.

En otra forma de realización del primer, segundo, tercer, cuarto o quinto aspecto, la tarea se soluciona mediante un procedimiento, un empleo o una mezcla de reacción, situándose el valor de pH del medio de cultivo acuoso entre 5 y 9, preferentemente 6 a 8, en el momento de la puesta en contacto.

25 Los inventores de la presente invención han verificado que, sorprendentemente, se puede separar una disolución hidrófoba orgánica de un medio de cultivo acuoso que comprende una célula metabólicamente activa, si la célula metabólicamente activa presenta una actividad reducida frente a su tipo salvaje de al menos una enzima que cataliza una de las reacciones de  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos.

30 Además, los inventores de la presente invención han hallado sorprendentemente que una célula metabólicamente activa, que presenta una actividad reducida frente a su tipo salvaje de al menos una enzima que cataliza una de las reacciones de  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos, presenta una menor demanda de oxígeno y una proporción más elevada de rendimiento de producto respecto a consumo de oxígeno respecto al producto objetivo en un procedimiento biotecnológico, con rendimiento de producción comparable.

35 Sin pretender vincularse a una teoría, los inventores sospechan que la actividad reducida de al menos una enzima que cataliza una de las reacciones de  $\beta$ -Oxidation, conduce a que la concentración de metabolitos no identificados hasta el momento, que actúan como detergentes, se reduzca en el medio de cultivo acuoso, de modo que, por una parte, se reduce la superficie de contacto entre disolución hidrófoba y las células metabólicamente activas que se encuentran en el medio de cultivo, sensibles al disolvente, en el cultivo de células bajo agitación del medio, lo que conduce a la reducción del estrés debido a disolvente para las células, y por otra parte se favorece la formación de fases separadas tras una desconexión del dispositivo de agitación.

40 La enseñanza según la invención se puede utilizar para la mejora de el procedimiento biotecnológico completo, que comprenden la obtención de productos como sustancias químicas bajo empleo de una célula procarionta metabólicamente activa, su cultivo en un medio acuoso y la elaboración del producto bajo empleo de un disolvente hidrófobo orgánico. En una forma de realización preferente, bajo el concepto "célula metabólicamente activa", como se emplea en este caso, se entiende una célula procarionta viva con actividad metabólica, preferentemente una célula que exprime, o de modo aún más preferente sobreexpone en forma activa una enzima relevante para la obtención biotecnológica del producto interesante. En el caso de la célula se puede tratar de una procarionta, incluyendo arqueas, preferentemente del grupo de las especies que comprende *Pseudomonas*, *Corynebacterium* y *Escherichia*. En una forma de realización aún más preferente, en el caso de la célula se trata de una célula bacteriana, de modo aún más preferente de una célula bacteriana gram-negativa, en el más preferente de los casos *E. coli*. En una forma de realización preferente, el concepto "célula" se emplea como sinónimo y término intercambiable por el concepto "microorganismo" en esta solicitud. Además, en el caso de la célula se puede tratar de una célula aislada o de una mezcla de diferentes células.

50

El especialista conoce numerosos medios de cultivo acuosos que son apropiados para la obtención o el cultivo de células, en especial células significativas desde el punto de vista biotecnológico. A éstos pertenecen igualmente medios completos, como medios LB, medios mínimos, como medios M9, así como medios selectivos, a modo de ejemplo aquellos que contienen una concentración de sales elevada y, por lo tanto, posibilitan solo el crecimiento de organismos halófilos, o al menos halotolerantes. En una forma de realización preferente, bajo el concepto “medio de cultivo acuoso”, como se emplea en este caso, se entiende un medio de cultivo de base acuosa, que está concebido, respecto a la totalidad de factores relevantes, en especial valor de pH, contenido en sales y temperatura, de modo que mantiene o favorece la viabilidad de células contenidas en el mismo, preferentemente microorganismos, y tanto el medio de cultivo acuoso como también la fase hidrófoba orgánica se presentan en forma líquida. Las demandas de temperatura de diversas células significativas desde el punto de vista biotecnológico se pueden extraer de libros de texto de microbiología y biología molecular, por ejemplo Fuchs/Schlegl, 2008. En una forma de realización preferente, el valor de pH del medio de cultivo acuoso en el momento de la puesta en contacto se sitúa entre 4 y 9, más preferentemente entre 4,5 y 8,5, del modo más preferente entre 6,5 y 7,5. En otra forma de realización preferente, la temperatura se sitúa entre 0 y 45 °C, más preferentemente entre 15 y 40 °C, del modo más preferente entre 20 y 37 °C.

El especialista conoce numerosos disolventes que se pueden emplear para producir una disolución hidrófoba orgánica. En una forma de realización preferente, bajo el concepto “hidrófobo”, como se emplea en este caso, se entiende la propiedad de un compuesto de formar una fase propia, claramente separada de la fase acuosa, en estado líquido en presencia de una fase líquida acuosa. En el caso de esta última se puede tratar de una fase líquida cohesiva o de una emulsión. En otra forma de realización preferente, 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, en otra forma de realización preferente, el concepto, como se emplea en este caso, se entiende de tal manera que un compuesto especificado de tal naturaleza 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. Los disolventes orgánicos comprenden disolventes del grupo que comprende alcanos, cicloalcanos, cicloalquenos, arilos, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, alcoholes, heterocicloalcanos, heterocicloalquenos y heteroarilos líquidos a temperatura ambiente, sustituidos y no sustituidos. La disolución hidrófoba orgánica puede ser también una mezcla que comprende más de un disolvente hidrófobo orgánico.

La  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos es una vía metabólica ampliamente extendida, que permite a los organismos procariontes y eucariontes oxidar del mismo modo ácidos grasos, y poner a disposición del metabolismo la energía química contenida en los mismos (Fujita *et al.*, 2007). En un sentido amplio, ésta comienza con la absorción de un ácido graso en la célula, en el caso de *E. coli* mediante el transportador FadL (Black, 1991), que la elimina a través de la membrana externa, o bien interna, de la célula bacteriana gram-negativa, y el producto génico FadD (Black *et al.*, 1992), que libera el ácido graso en forma de CoA-éster in el citosol. En tanto las condiciones lo requieran, el ácido graso se oxida en primer lugar en la posición  $\beta$  del éster de ácido graso CoA mediante una acil-CoA-deshidrogenasa, en el caso de *E. coli* FadE (Campbell and Cronan, 2002). Alternativamente, también se puede formar una molécula similar a partir de un ácido graso doblemente insaturado mediante reducción a través de una 2,4-dienoil-CoA-reductasa, en el caso de *E. coli* FadH. Una enzima multifuncional, la enoil-CoA-hidratasa/3-hidroxiacil-CoA-dehidrogenasa, en el caso de *E. coli* FadB, cataliza a continuación la hidratación bajo formación del alcohol secundario y su subsiguiente oxidación para dar cetona. En el último paso, una 3-cetoacil-CoA-tiolasa, en el caso de *E. coli* FadA, cataliza la disociación de cetoacil-CoA con el resultado de que se liberan acetil-CoA y un CoA-éster de ácido graso acortado en dos átomos de carbono en comparación con la molécula de partida. En tanto no se trate igualmente de acetil-CoA, este último se puede alimentar de nuevo al ciclo de  $\beta$ -oxidación y acortar bajo oxidación. En la regulación de la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos también participa FadR, un regulador del operón Fad, que comprende los genes necesarios para la degradación de ácidos grasos, sin que FadR catalice una reacción de  $\beta$ -oxidación. Bajo el concepto “enzima que cataliza una de las reacciones de  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos” se entiende cualquier enzima que interacciona directamente con el sustrato de ácido graso o una molécula producida a partir del mismo por la vía de acetil-CoA, lo reconoce preferentemente como sustrato, y cataliza su transformación a un producto metabólico situado próximo a acetil-CoA en esta vía de degradación, incluyendo preferentemente el importador de ácido graso, que ocasiona la absorción de ácido graso en la célula. A modo de ejemplo, entre estas enzimas según la anterior definición cuenta la acil-CoA-deshidrogenasa, ya que interacciona con el CoA-éster de ácido graso y cataliza su transformación en enoil-CoA, que se sitúa más cerca de acetil-CoA que el CoA-éster de ácido graso en la vía metabólica de la  $\beta$ -oxidación. Bajo el concepto “enzima que cataliza una de las reacciones de  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos”, como se emplea en este caso, se entiende cualquier enzima del grupo que comprende los productos génicos FadL y FadE de *E. coli* y/o sus variantes u homólogos de otros organismos. Los productos génicos FadA, FadB, FadD, FadL y FadE de *E. coli*, así como variantes y homólogos de numerosos organismos adicionales, utilizables desde el punto de vista biotecnológico, y sus secuencias de ácidos nucleicos y polipéptidos, se describen en el estado de la técnica, a modo de ejemplo FadA bajo el número de acceso AP009048.1, FadB bajo el número de acceso BAE77457.1, FadD bajo el número de acceso BAA15609.1, FadE bajo el número de acceso BAA77891.2 y FadL bajo el número de acceso BAA16205.1.

La enseñanza de la presente invención se puede realizar, o bien aplicar, no solo bajo empleo de, o bien en las secuencias exactas de aminoácidos o ácidos nucleicos de la macromolécula biológica aquí descrita, a modo de ejemplo mediante Knock out de un gen, que codifica para una enzima que cataliza una de las reacciones de  $\beta$ -oxidación, sino también bajo empleo de, o bien en variantes 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" significa una secuencia de ácido nucleico o una secuencia de aminoácido, en lo sucesivo empleadas como sinónimo y término intercambiable con el concepto "homólogo", como se emplea en este caso, otra secuencia de ácido nucleico o aminoácido, que presenta, respecto a la correspondiente secuencia de ácido nucleico o aminoácido de tipo salvaje original, una homología, en este caso empleada como sinónimo de identidad, de un 70, 75, 80, 85, 90, 92, 94, 96, 98, 99 % o un mayor porcentaje, estando delecionados o sustituidos preferentemente aminoácidos diferentes a los que forman el centro catalíticamente activo o son esenciales para la estructura o el plegamiento, o estando sustituidos éstos últimos únicamente de manera conservadora, 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 substratos 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 substratos. 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 codificada 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 como importador de ácido graso, como enoil-CoA-hidratasa, o bien FadE, o como acetyl-CoA-aciltransferasa, o bien FadB. 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. El especialista encuentra indicaciones para la identificación de secuencias de ADN por medio de hibridación, entre otros, en el manual "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" de la firma Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Alemania, 1993) y en Liebl *et al.* (International Journal of Systematic Bacteriology 41: 255-260 (1991)). En una forma de realización preferente, la hibridación tiene lugar bajo condiciones restrictivas, es decir, se forman solo híbridos en los que sonda y secuencia objetivo, es decir, los polinucleótidos tratados con la sonda, son idénticas en al menos un 70 %. Es sabido que la restricción de la hibridación, incluyendo los pasos de lavado, se influye, o bien se determina mediante variación de la composición del tampón, la temperatura y la concentración de sales. La reacción de hibridación se lleva a cabo generalmente con restricción relativamente reducida en comparación con los pasos de lavado (Hybaid Hybridisation Guide, Hybaid Limited, Teddington, UK, 1996). Para la reacción de hibridación se puede emplear, a modo de ejemplo, un tampón correspondiente al tampón 5x SSC a una temperatura de aproximadamente 50°C - 68°C. En este caso, también se pueden hibridar sondas con polinucleótidos que presentan menos de un 70 % de identidad respecto a la secuencia de la sonda. Tales híbridos son menos estables y se eliminan mediante lavado bajo condiciones restrictivas. Esto se puede conseguir, a modo de ejemplo, mediante reducción de la concentración de sales a 2x SSC y, en caso dado, seguidamente a 0,5x SSC (The DIG System User's Guide for Filter Hybridisation, Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania, 1995), ajustándose una temperatura de preferencia creciente en orden aprox. 50°C - 68°C, aprox. 52°C - 68°C, aprox. 54°C - 68°C, aprox. 56°C - 68°C, aprox. 58°C - 68°C, aprox. 60°C - 68°C, aprox. 62°C - 68°C, aprox. 64°C - 68°C, aprox. 66°C - 68°C. Son preferentes intervalos de temperatura de 64°C - 68°C o aprox. 66°C - 68°C. En caso dado es posible reducir la concentración de sales a una concentración correspondiente a 0,2 x SSC o 0,1 x SSC. Mediante aumento gradual de la temperatura de hibridación en pasos de aprox. 1 - 2°C de 50°C a 68°C se pueden aislar fragmentos de polinucleótidos, que presentan, a modo de ejemplo, en preferencia creciente en orden al menos un 70 % o al menos un 80 % o al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad respecto a la secuencia de la molécula de ácido nucleico empleada. Otras indicaciones para la hibridación se encuentran disponibles en el mercado en forma de los denominados kits (por ejemplo DIG Easy Hyb

de la firma Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, catálogo No. 1603558). En una forma de realización preferente, el concepto "variante" comprende un ácido nucleico, como se emplea en este caso, 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 generabilidad del código genético.

5 Con el desarrollo de modernos métodos genéticos, microbiológicos y de biología molecular, el especialista dispone de numerosas herramientas con las que puede medir rutinariamente la actividad de enzimas presentes en células vivas, e influir sobre la misma. Para la determinación de la actividad de una enzima, que se presenta en forma de una suspensión, un comprimido, o se puede extraer en forma procesada de un cultivo celular, se pueden emplear y evaluar ensayos enzimáticos estándar, como se describe en libros de texto, a modo de ejemplo Cornish-Bowden,  
10 1995. El estado de la técnica da a conocer numerosos ensayos que son apropiados especialmente para la medida de la actividad de enzimas, que catalizan una de las reacciones de  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos, a modo de ejemplo en Kameda & Nunn (1981), Marrakchi *et al.* (2003), Lobo *et al.* (2001) y Xu *et al.* (2011). También procedimientos aplicables rutinariamente para la reducción de la actividad de una enzima en una célula, a modo de ejemplo mediante mutagénesis no orientada de células mediante exposición frente a radiación radioactiva, seguida de enriquecimiento o exploración de mutantes, mediante introducción selectiva localmente de mutaciones puntuales, o mediante el Knock out de un gen integrado por vía cromosómica en una célula, que codifica para una enzima activa, se describen en el estado de la técnica, a modo de ejemplo en Maniatis *et al.* (1989) oder in Fuchs & Schlegl (2007). En el caso especial del producto génico Fad, para la reducción de la actividad se ofrece también la sobreexpresión de un represor transcripcional, a modo de ejemplo de FadR (Fujita *et al.*, 2007). También es posible una reducción de la actividad a base de interferencia de ARN (Tuschl, 2001) o bajo empleo de inhibidores específicos. En una forma de realización preferente, la formulación "presentando la célula una actividad reducida frente a su tipo salvaje" de un enzima, como se emplea en este caso, significa que la actividad de la enzima en la célula modificada se ha reducido frente a la actividad de la misma enzima en una célula de tipo salvaje. La reducción relativa asciende, en el orden de preferencia creciente, a un 90, 95, 99 o un mayor porcentaje de actividad. En una forma de realización especialmente preferente, ya no es identificable una actividad de la enzima frente al fondo.

En el segundo paso del procedimiento según la invención se produce la puesta en contacto del medio de cultivo acuoso con una disolución hidrófoba orgánica. En una forma preferente de realización de la presente invención, el concepto "puesta en contacto", como se emplea en este caso, significa que el medio de cultivo acuoso y la disolución orgánica se ponen en contacto directamente sin que esté interpuesta una barrera mecánica insuperable para un medio de cultivo acuoso y/o una disolución hidrófoba orgánica, a modo de ejemplo una membrana inorgánica. A modo de ejemplo, el medio de cultivo acuoso se puede disponer en un fermentador, y la disolución orgánica se añade al medio de cultivo en el mismo fermentador, de modo que se ambos líquidos se pueden mezclar. En una forma de realización preferente, la puesta en contacto tiene lugar al menos parcialmente bajo agitación, afluencia de gas o medidas similares que sean apropiadas para aumentar la superficie de contacto de ambas fases.

35 Tras el segundo paso se separa la disolución hidrófoba orgánica del medio de cultivo acuoso. Debido a la capacidad inherente de este sistema para la formación de dos fases, esto es un proceso fácil de realizar por el especialista, que puede realizar fácilmente mediante reposo del recipiente y subsiguiente decantación de una fase. Alternativamente se puede emplear un embudo de decantación. En el caso de puntos de ebullición suficientemente diferentes existe la posibilidad de extraer la fase que entra en ebullición a menores temperaturas, en cuyo caso se trata generalmente de la fase orgánica, mediante la aplicación de vacío. Se pueden eliminar cantidades reducidas de agua remanente en la fase orgánica bajo empleo de agentes desecantes inorgánicos, como hidruro de calcio, cloruro de calcio anhidro, gel de sílice, sulfato sódico anhidro, hidróxido sódico o similares.

45 El procedimiento según la invención se puede llevar a cabo bajo empleo de disolventes hidrófobos orgánicos habituales, que comprenden alcanos, cicloalcanos, cicloalquenos, arilos, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, alcoholes, heterocicloalcanos, heterocicloalquenos y heteroarilos líquidos a temperatura ambiente, sustituidos y no sustituidos. También son apropiados disolventes hidrófobos orgánicos que no son líquidos de por sí, en tanto sean parte de una mezcla de disolventes que es líquida en su totalidad. En este contexto se debe considerar, en caso dado, que muchos disolventes presentan una acción más o menos tóxica sobre células metabólicas. Es decir, si la célula debe mantener su actividad metabólica al menos temporalmente, se deben emplear concentraciones correspondientes, moderadas o incluso de acción no tóxica, del disolvente hidrófobo. En una forma de realización especialmente preferente, en el caso del disolvente se trata de un ácido graso saturado o insaturado con al menos ocho, preferentemente al menos doce átomos de carbono, a modo de ejemplo ácido láurico, ácido oleico o ácido erúrico, o los ésteres metílicos de los mismos. En otra forma de realización preferente, en el caso del disolvente se trata de un ácido graso de la fórmula  $\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_x - \text{COOH}$ , pudiendo ser x 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18,  
50 19, 20, 21, 22 o más. En otra forma de realización preferente se trata de un ácido graso insaturado con un doble enlace, de modo especialmente preferente en la posición 9, de modo especialmente preferente ácido oleico. En otra forma de realización especialmente preferente, en el caso del disolvente se trata de ácido hexanoico.

El volumen de la disolución hidrófoba orgánica se debía dimensionar de modo que la fase orgánica se pueda separar fácilmente y, en una forma de realización preferente, asciende a un 2 hasta un 98, preferentemente un 5 a



un 95, de modo aún más preferente un 10 a un 40, del modo más preferente un 20 a un 30 por ciento del volumen total de medio de cultivo acuoso y disolución hidrófoba orgánica.

5 Como célula metabólicamente activa se selecciona generalmente una célula que puede generar un producto de especial interés. A tal efecto es especialmente ventajoso el empleo de una célula recombinante. En una forma de realización preferente, bajo el concepto "recombinante", como se emplea en este caso, se entiende que la molécula de ácido nucleico denominada recombinante, introducida en la "célula recombinante", no es una molécula de ácido nucleico extraída de la naturaleza, sino producida bajo empleo de procedimientos de biología molecular o químico-sintéticos, o bien que la célula denominada recombinante comprende una molécula de ácido nucleico recombinante o un polipéptido codificado por la misma. En el estado de la técnica se describen procedimientos rutinarios de biología molecular para la producción de moléculas de ácido nucleico y células recombinantes, a modo de ejemplo en Sambrook *et al.* (1989) o Schlegl & Fuchs (2007).

15 Además es especialmente ventajoso que la célula presente o, de modo especialmente preferente, sobreexpresa una enzima que genera un producto o un precursor o intermedio del mismo. Esto se puede conseguir insertándose en la célula un vector, que comprende una molécula de ácido nucleico codificante para la enzima, mediante transformación o similares, o incorporándose la molécula de ácido nucleico que codifica para la enzima en el equipamiento genético de la célula, a modo de ejemplo un cromosoma. Para numerosos tipos de células significativos desde el punto de vista biotecnológico, por ejemplo *E. coli*, son conocidos procedimientos y vectores apropiados, que se pueden emplear para la expresión o la sobreexpresión de una molécula de ácido nucleico, a modo de ejemplo los vectores de tipo Typ pET o pGEX y células apropiadas para su expresión (Moffatt & Studier (1986), Rosenberg *et al.* (1987) y Studier *et al.* (1990).

20 El procedimiento según la invención se ofrece especialmente cuando se emplea una célula metabólicamente activa para metabolizar un disolvente hidrófobo orgánico, o para catalizar una reacción química bajo empleo del disolvente hidrófobo orgánico como sustrato. Entre estas enzimas cuentan las alcano hidroxilasas.

25 En una forma de realización especialmente preferente, en el caso de una "alcano hidroxilasa", como se emplea en este caso, se trata de una enzima que cataliza la oxidación de un alcano para dar alcohol, aldehído/cetona y/o para dar ácido carboxílico, de modo predominante preferentemente para dar alcohol. En el estado de la técnica se describen frecuentemente alcano hidroxilasas, a modo de ejemplo en Grant *et al.* (2011) o Koch *et al.* (2009). En una forma de realización especialmente preferente, en el caso de la alcano hidroxilasa se trata de una "alcano hidroxilasa de tipo alkB". AlkB representa una oxidoreductasa 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 a AlkG. AlkG es 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 "alcano-hidroxilasam de tipo alkB", como se emplea en este caso, se entiende una alcano hidroxilasa en posición de membrana. En otra forma de realización, bajo el mismo concepto "alcano hidroxilasa de tipo alkB", como se entiende en este caso, 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 secuencia de AlkB de *Pseudomonas putida* Gpo1 (código de banco de datos: CAB54050.1, éste y todos los demás códigos de banco de datos empleados en este documento proceden del banco genico banco de datos proteicos de NCBI en la edición disponible el 9 de noviembre de 2011). El concepto "secuencia", como se emplea en este caso, se puede referir a la secuencia de aminoácidos de un polipéptido y/o a la secuencia de ácidos nucleicos codificante para el mismo.

45 El procedimiento se puede emplear para oxidar en primer lugar y aminorar a continuación ácidos grasos o sus ésteres. A modo de ejemplo, a tal efecto es apropiado, a modo de ejemplo, un sistema enzimático como se describe en la solicitud de patente internacional WO 2009/077461. En el caso de la célula metabólicamente activa, aquí se trata de una célula que presenta una alcano hidroxilasa recombinante y una transaminasa, preferentemente además una enzima del grupo que comprende alcohol deshidrogenasa, alanina deshidrogenasa y lactama-deshidrogenasa. En una forma de realización preferente, bajo el concepto "alcohol deshidrogenasa", como se emplea en este caso, se entiende una enzima que oxida un aldehído, o bien una cetona, para dar el correspondiente alcohol primario, o bien secundario. Los ejemplos comprenden las alcohol deshidrogenasas de *Ralstonia eutropha* (ACB78191.1), *Lactobacillus brevis* (YP\_795183.1), *Lactobacillus kefir* (ACF95832.1), de hígado de caballo, de *Paracoccus pantotrophus* (ACB78182.1) y *Sphingobium yanoikuyae* (EU427523.1), así como las respectivas variantes de las mismas. En una forma de realización preferente, bajo el concepto "transaminasa", como se emplea en este caso, se entiende una enzima que cataliza la transferencia de grupos  $\alpha$ -amino de un ácido donador, preferentemente un aminoácido, a una molécula aceptora, preferentemente un ácido  $\alpha$ -cetocarboxílico. A modo de ejemplo se puede emplear la transaminasa de *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 (código de banco de datos NP\_901695). En una forma de realización preferente, bajo el concepto "alanina deshidrogenasa", como se emplea en este caso, se entiende una enzima que cataliza la transformación de L-alanina bajo consumo de agua y NAD<sup>+</sup> en piruvato, amoníaco y NADH. A modo de ejemplo se pueden emplear las alanina deshidrogenasas de *Bacillus subtilis* (código de banco de datos L20916), *Rhizobium leguminosarum* (código de banco de datos

CP001622), *Vibrio proteolyticus* (código de banco de datos AF070716), *Mycobacterium tuberculosis* (código de banco de datos X63069), *Enterobacter aerogenes* (código de banco de datos AB013821).

La presente invención se refiere no solo al procedimiento según la invención, sino también al empleo de un Knock out de una enzima, que cataliza una de las reacciones de  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos, seleccionada a partir del grupo que comprende FadE y FadL, preferentemente FadE, como parte del equipamiento genético de una célula metabólicamente activa para la mejora de la separación de una disolución hidrófoba orgánica de un medio de cultivo acuoso que comprende la célula metabólicamente activa. Si en el ámbito de cualquier procedimiento existe también la necesidad de separar una disolución hidrófoba orgánica de un medio de cultivo acuoso que comprende una célula metabólicamente activa, según la invención, en lugar de una célula metabólicamente activa sin modificación correspondiente del metabolismo del ácido graso, es decir una célula con actividad de las enzimas inalterada o incluso aumentada frente a su tipo salvaje, que cataliza una reacción de  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos, del grupo que comprende FadE y FadL, preferentemente FadE, se debe emplear una célula en la que esté eliminada al menos una enzima, que cataliza una de las reacciones de  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos, seleccionada a partir del grupo que comprende FadE y FadL, de modo más preferente FadE.

Este knock out de un gen Fad se puede emplear independientemente de que se deban utilizar células metabólicamente activas para la producción de un ácido graso o de un derivado del mismo, o de otra molécula que se podría degradar a través de la vía metabólica de la  $\beta$ -oxidación.

En una forma de realización preferente, bajo el concepto "Knock-out", como se emplea en este caso, se debe entender que la transcripción y/o traducción del gen, o bien de su producto génico, es reducido en comparación con la célula de tipo salvaje, a modo de ejemplo mediante delección de una parte del gen o del gen completo, mediante inserción de un codón de terminación en el punto apropiado, mediante eliminación de una parte esencial del promotor o mediante eliminación del punto de enlace ribosómico.

En la forma de realización más preferente, el procedimiento según la invención comprende los pasos a) puesta a disposición de un medio de cultivo acuoso que comprende una célula metabólicamente activa, b) puesta en contacto del medio de cultivo acuoso con una disolución hidrófoba orgánica, y c) separación de la disolución hidrófoba orgánica del medio de cultivo acuoso, presentando la célula una actividad de FadE o de una variante reducida frente a su tipo salvaje, en el caso de la célula metabólicamente activa se trata de una cepa recombinante de *E. coli*, que presenta un alcano hidroxilasa recombinante AlkGT de *Pseudomonas putida* o una variante de la misma, así como una transaminasa recombinante, y el disolvente hidrófobo orgánico comprende una mezcla de ácido láurico o ácido hexanoico, o bien el éster metílico de los mismos, y un ácido graso insaturado, preferentemente ácido oleico o ácido erúcido, en el más preferente de los casos ácido oleico, ascendiendo preferentemente la proporción de ácido oleico o ácido erúcido respecto a ácido laurico o ácido hexanoico, o bien el éster metílico de los mismos, a 20:80 hasta 80 a 20, preferentemente 20:80 hasta 40:60.

En la forma de realización más preferente, el procedimiento según la invención es un procedimiento para la producción de un ácido  $\omega$ -aminocarboxílico, que comprende los pasos a) puesta a disposición de un medio de cultivo acuoso que comprende una célula metabólicamente activa, b) puesta en contacto del medio de cultivo acuoso con una disolución hidrófoba orgánica, y c) separación de la disolución hidrófoba orgánica del medio de cultivo acuoso, presentando la célula una actividad reducida frente a su tipo salvaje de al menos una enzima, que cataliza una de las reacciones de  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos, tratándose en el caso de la célula preferentemente de *E. coli*, y siendo FadE la enzima que cataliza una de las reacciones de  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos, y estando la célula también modificada mediante técnica génica de modo que produce una cantidad de ácido  $\omega$ -aminocarboxílico elevada frente a su tipo salvaje, preferentemente al estar equipada la misma de un sistema de enzimas recombinantes que comprende una alcano hidroxilasa AlkBGT de *Pseudomonas putida*, opcionalmente una alcohol deshidrogenasa y una  $\omega$ -transaminasa. En otra de las formas de realización más preferentes, la invención se refiere a una célula que presenta una actividad reducida frente a su tipo salvaje de al menos una enzima que cataliza una de las reacciones de  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos, tratándose en el caso de la célula preferentemente de *E. coli* y siendo FadE la enzima que cataliza una de las reacciones de  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos, y estando la célula también modificada mediante técnica génica de modo que produce una cantidad de ácido  $\omega$ -aminocarboxílico elevada frente a su tipo salvaje, preferentemente al estar equipada la misma de un sistema de enzimas recombinantes que comprende una alcano hidroxilasa AlkBGT de *Pseudomonas putida*, opcionalmente una alcohol deshidrogenasa y una  $\omega$ -transaminasa.

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

La Fig. 1 muestra diferencias en la separación de fases en la producción de ALSME bajo empleo del mutante de  $\Delta$ FadE W3110  $\Delta$ FadE [alkB-alaD-TA] (en lo sucesivo denominado también " $\Delta$ Fad") (izquierda) y de la cepa, idéntica aparte de la falta de delección de  $\Delta$ fadE, W3110 [alkB-alaD-TA] (en lo sucesivo denominada también tipo salvaje ("WT")) (derecha). La flecha muestra la clara separación de la fase orgánica y de la fase acuosa después de diez

minutos en el caso del mutante, mientras que, en el caso de empleo de la otra cepa, no se puede observar una separación de fases después del mismo tiempo.

La Fig. 2 muestra el mismo experimento que la Fig. 1, a pesar de que el medio de reacción se envasó en tubos Falcon tras la fermentación.

- 5 La Fig. 3 muestra la entrada de oxígeno en forma de OTR (velocidad de transferencia de oxígeno) y la expulsión de dióxido de carbono en forma de CTR (velocidad de transferencia de dióxido) de ambas cepas en el mismo experimento que en la Fig. 1.

La Fig. 4 muestra las concentraciones de ALSME durante el tiempo en el medio en el mismo experimento que en la Fig. 1.

- 10 La Fig. 5 muestra la concentración de diversos productos en la reacción de laurato de metilo (LSME) como se describe en el ejemplo 2, es decir, ácido aminoláurico (ALS), aminolaurato de metilo (ALSME), ácido  $\omega$ -carboxiláurico (DDS),  $\omega$ -carboxilaurato de metilo (DDSME), ácido  $\omega$ -hidroxiláurico (HLS),  $\omega$ -hidroxilaurato de metilo (HLSME) y ácido  $\omega$ -oxoláurico (OLS). Como cepas se investigaron la cepa  $\Delta$ FadE (Fig. 5a), el tipo salvaje (W3110) (Fig. 5b), la cepa  $\Delta$ FadL (Fig. 5c) y una cepa con  $\Delta$ FadE y  $\Delta$ FadL (Fig. 5d).

- 15 La Fig. 6 muestra las curvas de OTR (Fig. 6a) y CTR (Fig. 6b) del ensayo descrito en el ejemplo 2.

La Fig. 7 muestra diferencias en la separación de fases en la producción de ALSME bajo empleo de la cepa  $\Delta$ FadE, de tipo salvaje (W3110),  $\Delta$ fadL y  $\Delta$ FadE/ $\Delta$ fadL que se observaron en el ejemplo 2. Las flechas muestran la clara separación de la fase orgánica y de la fase acuosa después de diez minutos en el caso de los mutantes, mientras que, en el caso de empleo de la cepa de tipo salvaje, no se puede observar una separación de fases después del mismo tiempo.

- 20

Ejemplo 1: aceleración de la separación de una fase acuosa de una fase hidrófoba bajo empleo de un mutante de  $\Delta$ fadE en la producción biotecnológica de aminolaurato de metilo

La biotransformación de laurato de metilo en aminolaurato de metilo se llevó a cabo en el sistema de fermentación paralela de 8 cubetas de DASGIP con las cepas W3110  $\Delta$ FadE [alkB-alaD-TA] y W3110 [alkB-alaD-TA]. En el caso de W3110 [alkB-alaD-TA] se trata de una cepa de *E. coli* W3110, que comprende un plásmido basado en pBR322 con sistema de oxidación y transaminación, que comprende oxidorreductasa AlkB, alanina deshidrogenasa y transaminasa, como se describe en el documento WO2009077461. W3110  $\Delta$ FadE [alkB-alaD-TA] es idéntico a la última cepa, aparte de que el gen codificante para FadE está deletado y, por consiguiente, la cepa no presenta una actividad de acil-CoA-deshidrogenasa.

- 25

Para la fermentación se emplearon reactores de 1 L. Las sondas de pH se calibraron por medio de un calibrado de dos puntos con disoluciones valoradas de pH 4,0 y pH 7,0. Los reactores se llenaron con 300 mL de agua potable y se trataron en autoclave 20 min a 121°C para garantizar esterilidad. A continuación se polarizaron las sondas de pO<sub>2</sub> durante la noche (al menos durante 6 h) en el sistema DASGIP. A la mañana siguiente se retiró el agua en una mesa de trabajo limpia, y se reemplazó por 300 mL de medio de alta densidad celular con 100 mg/L de ampicilina. En lo sucesivo se calibraron las sondas de pO<sub>2</sub> con un calibrado de un punto (agitador: 400 rpm / gasificación: 10 sL/h de aire), y se limpiaron los tramos de alimentación, agente de corrección y agente de inducción por medio de limpieza in situ. A tal efecto se lavaron los tubos con un 70 % de etanol, a continuación con NaOH 1 M, después con agua completamente desalinizada estéril, y en último lugar con el respectivo medio.

- 30
- 35

Las cepas de *E. coli* productoras de ALS y ALSME se absorbieron primeramente a partir de los respectivos criocultivos en medio LB (25 mL en un matraz con deflectores de 100 mL) con 100 mg/L de ampicilina durante la noche a 37°C y 200 rpm aprox. durante 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 de 500 g/L, tratada en autoclave por separado, con un 1 % de MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O y un 2,2% de NH<sub>4</sub>Cl), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,76 g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 19,08 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 12,5 g/L, extracto de levadura 6,66 g/L, citrato trisódico dihidrato 2,24 g/L, disolución de citrato férrico 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 (HCl (37 %) 36,50 g/L, MnCl<sub>2</sub>\*4H<sub>2</sub>O 1,91 g/L, ZnSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O 1,87 g/L, ácido etilendiaminotetraacético dihidrato 0,84 g/L, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0,30 g/L, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>\*2H<sub>2</sub>O 0,25 g/L, CaCl<sub>2</sub>\*2H<sub>2</sub>O 4,70 g/L, FeSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O 17,80 g/L, CuCl<sub>2</sub>\*2H<sub>2</sub>O 0,15 g/L)) (por cada cepa 25mL en un matraz con deflectores de 100 mL) con 100 mg/L de Ampicillin, y se incubaron durante 5,5 h más a 37°C / 200 rpm.

- 40
- 45

- 50 La densidad óptica de los cultivos a 600 nm se determinó en W3110  $\Delta$ FadE [alkB-alaD-TA] con 6,9 y en W3110 [alkB-alaD-TA] con 7,4. Para inocular los reactores con una densidad óptica de 0,1 se extrajeron respectivamente 4,0 mL, o bien 4,4 mL de ( $\Delta$ FadE) en una jeringa de 5 mL (bajo condiciones estériles), y se inocularon los reactores por medio de una cánula a través de un séptum revestido con etanol al 70 %.

## ES 2 688 295 T3

Se empleó el siguiente programa estándar:

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	XO <sub>2</sub> (mezcla gaseosa)	de	a	F (flujo gaseoso)	de	a
	0%	30%		0%	100%		15%	80%
Crecimiento y biotransformación	400 rpm	1500 rpm	Crecimiento y biotransformación	21 %	21%	Crecimiento y biotransformación	6 sL/h	72 sL/h

Secuencia	
Fortaleza de desencadenante	31 % de DO (1/60h)
Inducción IPTG	2 h tras inicio de alimentación
Desencadenante de alimentación	50% de DO
Velocidad de alimentación	3 [mL/h]

- 5 El experimento llevado a cabo se puede estructurar en dos fases, el cultivo, en el que las células alcanzarán una determinada densidad óptica, y la subsiguiente biotransformación, en la que tendrá lugar una reacción a aminolaurato de enzimas formadas en la expresión tras la adición del sustrato laurato de metilo. Por un lado, los valores de pH se regularon a pH 6,8 con amoníaco (12,5 %). Durante el cultivo y la biotransformación se reguló el oxígeno disuelto (DO, oxígeno disuelto) en el cultivo en un 30 % a través del índice de revoluciones del agitador y la
- 10 velocidad 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 MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O y un 2,2% de NH<sub>4</sub>Cl), a través de un pico de DO. Con el inicio de la alimentación se redujo también la temperatura de 37°C previamente a 30°C. La expresión de la transaminasa se indujo 2 h después del inicio 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
- 15 (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.

El inicio de la fase de biotransformación se efectuó 14 h después del inicio de la alimentación. A tal efecto se añadieron 150 mL de una mezcla de laurato de metilo y el intercambiador iónico ácido oleico (técnico al 90 %) como carga al caldo de fermentación. Para poner a disposición un donador de grupos amino para la transaminasa se

- añadieron 5 mL de una disolución de sulfato amónico 3M al caldo de fermentación media hora antes del inicio de la biotransformación. Para la toma de muestras se extrajeron 2 mL de caldo de fermentación de la caldera y se diluyó y se extrajo una parte del mismo 1/20 en una mezcla de acetona-HCl ( $c(\text{HCl}) = 0,1 \text{ mol/L}$ ). Se tomaron muestras de todos los reactores 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 7.5 h, 10,5 h, 19.5 h y 21 h tras el inicio de la biotransformación. Las velocidades de conversión para oxígeno (OTR = velocidad de transferencia de oxígeno) y carbono (CTR = velocidad de transferencia de carbono) se determinaron durante la fermentación a través de la analítica de gas de escape en los sistemas DASGIP. La fermentación se concluyó 21 h después del inicio de la biotransformación. Se desconectó el agitador, la gasificación, la regulación de temperatura y la regulación de pH y se dejó reposar la caldera 5-10 minutos.
- 5
- 10 Resultados:
- durante la fase de biotransformación, en el caso de W3110  $\Delta\text{FadE}$  [alkB-alaD-TA] con formación comparable, incluso ligeramente acrecentada del producto ALSME, se muestra un menor consumo de oxígeno que en el caso de W3110 [alkB-alaD-TA] (véase Fig. 3 y 4).
- 15 Después de 10 minutos se observa una clara separación de fases en proporción aprox. 40 % de fase superior, aprox. 60 % de fase inferior, en la caldera con la cepa W3110  $\Delta\text{FadE}$  [alkB-alaD-TA]. Entre ambas fases había una capa delgada de interfase. De la fase inferior y superior se envasaron muestras en un tubo Falcon de 15 mL y se centrifugaron a 5500 x g durante 10 minutos. Después se mostró que en el tubo con la fase inferior se encontraba fase acuosa y biomasa en aprox. un 95 %. En el tubo con la fase superior se pudo observar que la fase superior estaba constituida por un 60 % de proporción orgánica. En la caldera con la cepa W3110 W3110 [alkB-alaD-TA] se presentaba una emulsión homogénea después de 10 minutos, y también después de otros 20 minutos de tiempo de espera no se mostró una separación de fases.
- 20
- Ejemplo 2: aceleración de la separación de una fase acuosa de una fase hidrófoba bajo empleo de un mutante de  $\Delta\text{fadL}$ , así como de un mutante de  $\Delta\text{FadE}$   $\Delta\text{fadL}$  en la producción biotecnológica de aminolaurato de metilo
- Análogamente al ejemplo 1 se llevaron a cabo experimentos con las cepas
- 25 W3110  $\Delta\text{fadL}$  [alkB-alaD-TA] y
- W3110  $\Delta\text{fadE}$   $\Delta\text{fadL}$  [alkB-alaD-TA], así como
- W3110  $\Delta\text{fadE}$  [alkB-alaD-TA] y
- W3110 [alkB-alaD-TA]
- como controles.
- 30 De nuevo se empleó el sistema de fermentación paralela de 8 cubetas DASGIP con exactamente el mismo protocolo y los parámetros que se describen en el ejemplo 1.
- Tras el inicio de la biotransformación mediante adición de la mezcla de laurato de metilo/ácido oleico se tomaron muestras después de 1,25, 2,5, 3,5, 20,5, 22,5 y 23,5 horas, y se elaboraron según el método citado anteriormente. los resultados se reúnen en las Figs. 5, 6 y 7.
- 35 Después de 24 horas se interrumpieron las biotransformaciones, se concluyó la regulación de pH, temperatura y DO y se dejaron reposar los reactores 5-10 minutos.
- Como en el experimento citado anteriormente, también en este caso se pudo observar una clara separación de fase acuosa de la fase orgánica tras un tiempo breve, en tanto estuviera desactivado al menos uno de los genes Fad. En el caso del tipo salvaje empleado como biocatalizador, es decir, sin delección de uno de los genes Fad, no se puede
- 40 identificar ningún tipo de separación de fases (véase la Fig. 7).
- Se mostró igualmente que en las cepas con al menos una delección de Fad se ha reducido el consumo de oxígeno frente al tipo salvaje (Fig. 6a).

Citas bibliográficas:

WO 2009/077461: ácidos  $\omega$ -aminocarboxílicos o sus lactamas, células productoras, recombinantes

- J Sangster, Octanol-Water Partition Coefficients: Fundamentals and Physical Chemistry, Vol. 2 of Wiley Series in Solution Chemistry, John Wiley & Sons, Chichester, 1997
- F M Ausubel (1995), Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, Inc.
- A M Lesk (2008), Introduction to Bioinformatics, 3rd Edition
- 5 Y Fujita, H Matsuoka, and K Hirooka (2007) Mol. Microbiology 66(4), 829-839
- P N Black (1991) J. Bacteriol. 173, 435-442
- P N Black, C C DiRusso, A K Metzger, and T L Heimert (1992) J. Biol. Chem. 267, 25513-25520
- J. W Campbell & J E Cronan (200) J. Bacteriol. 184, 3759-3764
- A Cornish-Bowden (1995), Fundamentals of Enzym Kinetics, Portland Press Limited, 1995
- 10 S Lobo, G Florova, and KA Reynolds (2001) Biochemistry 40 (39), 11955-64
- X Yu, T Liu, F Zhu, and C Khosla (2011) PNAS, elektronische Veröffentlichung vor Drucklegung K Kameda & W D Nunn (1981) J. Biol. Chem. 256, 5702-5707
- Hi Marrakchi, W E DeWolf, C Quinn, J West, B J Polizzi, C Y So et al. (2003) Biochem. J. 370, 1055-1062
- 15 Sambrook/Fritsch/Maniatis (1989): Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd edition
- Fuchs/Schlegel (2007) Allgemeine Mikrobiologie, 2008, Georg Thieme Verlag
- B A Moffatt, and F W Studier (1986) J. Mol. Biol. 189, 113-130
- A H Rosenberg, B N Lade, D Chui, S Lin, J J Dunn, and F W Studier (1987) Gene 56, 125-135
- F W Studier, A H Rosenberg, J J Dunn, and J W Dubendorff (1990) Meth. Enzymol. 185, 60-89
- 20 C Grant, J M Woodley, F Baganz (2011) Enzyme and Microbial Technology, 480-486
- D J Koch, M M Chen, J B van Beilen, and F H Arnold (2009) Appl. and Env. Microbiology, 337-344
- T Tuschl (2001) ChemBioChem 2: 239-145

**REIVINDICACIONES**

1.- Procedimiento que comprende los pasos

- 5 a) puesta a disposición de un medio de cultivo acuoso que comprende una célula metabólicamente activa,  
 b) puesta en contacto del medio de cultivo acuoso con una disolución hidrófoba orgánica,  
 c) separación de la disolución hidrófoba orgánica del medio de cultivo acuoso,

presentando la célula una actividad reducida frente a su tipo salvaje de al menos una enzima, que cataliza una de las reacciones de  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos,

presentando una alcano hidroxilasa recombinante de tipo alkB,

tratándose de una célula procariota en el caso de la célula,

10 siendo la reducción de la actividad un 90 o un mayor porcentaje de la actividad del tipo salvaje,

tratándose, en el caso de la enzima que cataliza una de las reacciones de  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos, de una enzima del grupo que comprende FadL y FadE, o sus variantes de las mismas,

15 representando las variantes otra secuencia de ácidos nucleicos, que presenta una identidad de un 70 o un mayor porcentaje respecto a la correspondiente secuencia de ácido nucleico de tipo salvaje original, y presentando las variantes la misma actividad enzimática de la molécula de tipo salvaje,

comprendiendo la disolución orgánica al menos un disolvente del grupo que comprende alcanos, cicloalcanos, cicloalquenos, arilos, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, alcoholes, heterocicloalcanos, heterocicloalquenos y heteroarilos líquidos a temperatura ambiente, sustituidos y no sustituidos, y

20 significando "disolución hidrófoba orgánica" que la disolución orgánica presenta un valor P cuyo logaritmo decimal es mayor que 0.

2.- Procedimiento según la reivindicación 1, comprendiendo la disolución orgánica un ácido graso con más de 12 átomos de carbono o un éster del mismo, preferentemente ácido oleico, ácido erúico o laurato de metilo.

25 3.- Empleo de una célula procariota metabólicamente activa que presenta una actividad reducida frente a su tipo salvaje de una enzima, que cataliza una de las reacciones de  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos, de una enzima seleccionada a partir del grupo FadL y FadE, y variantes de las mismas,

que presenta una alcano hidroxilasa recombinante de tipo alkB,

siendo la reducción de la actividad un 90 o un mayor porcentaje de la actividad del tipo salvaje,

30 representando las variantes otra secuencia de ácidos nucleicos, que presenta una identidad de un 70 o un mayor porcentaje respecto a la correspondiente secuencia de ácido nucleico de tipo salvaje original, y presentando las variantes la misma actividad enzimática de la molécula de tipo salvaje,

para la mejora de la separación de una disolución hidrófoba orgánica de un medio de cultivo acuoso que comprende la célula metabólicamente activa,

35 comprendiendo la disolución orgánica al menos un disolvente del grupo que comprende alcanos, cicloalcanos, cicloalquenos, arilos, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, alcoholes, heterocicloalcanos, heterocicloalquenos y heteroarilos líquidos a temperatura ambiente, sustituidos y no sustituidos, y

significando "disolución hidrófoba orgánica" que la disolución orgánica presenta un valor P cuyo logaritmo decimal es mayor que 0.

40 4.- Empleo de un knock out de una enzima, siendo la reducción de la actividad un 90 o un mayor porcentaje de la actividad de tipo salvaje, que cataliza una de las reacciones de  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos, seleccionada a partir del grupo que comprende FadE y FadL, o variantes de las mismas, representando las variantes otra secuencia de ácidos nucleicos, que presenta una identidad de un 70 o un mayor porcentaje respecto a la correspondiente secuencia de ácido nucleico de tipo salvaje original, y presentando las variantes la misma actividad enzimática de la molécula de tipo salvaje,

- 5 como parte del equipamiento genético de una célula procariota metabólicamente activa que presenta una alcano hidroxilasa recombinante de tipo alkB, para la mejora de la separación de una disolución hidrófoba orgánica de un medio de cultivo acuoso que comprende la célula metabólicamente activa, comprendiendo la disolución orgánica al menos un disolvente del grupo que comprende alcanos, cicloalcanos, cicloalquenos, arilos, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, alcoholes, heterocicloalcanos, heterocicloalquenos y heteroarilos líquidos a temperatura ambiente, sustituidos y no sustituidos, y
- significando "disolución hidrófoba orgánica" que la disolución orgánica presenta un valor P cuyo logaritmo decimal es mayor que 0.
- 10 5.- Célula procariota que presenta una actividad reducida frente a su tipo salvaje de una enzima que cataliza una de las reacciones de  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos, que comprende además una alcano hidroxilasa recombinante de tipo alkB, siendo la reducción de la actividad un 90 o un mayor porcentaje de la actividad de tipo salvaje,
- tratándose, en el caso de la enzima que cataliza una de las reacciones de  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos, de una enzima del grupo FadE y FadL o sus sus variantes de las mismas,
- 15 representando las variantes otra secuencia de ácidos nucleicos, que presenta una identidad de un 70 o un mayor porcentaje respecto a la correspondiente secuencia de ácido nucleico de tipo salvaje original, y presentando las variantes la misma actividad enzimática de la molécula de tipo salvaje.
- 20 6.- Mezcla de reacción que comprende una disolución acuosa con una célula metabólicamente activa según la reivindicación 5 y una disolución hidrófoba orgánica, comprendiendo la disolución hidrófoba orgánica al menos un disolvente del grupo que comprende alcanos, cicloalcanos, cicloalquenos, arilos, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, alcoholes, heterocicloalcanos, heterocicloalquenos y heteroarilos líquidos a temperatura ambiente, sustituidos y no sustituidos, y
- significando "disolución hidrófoba orgánica" que la disolución orgánica presenta un valor P cuyo logaritmo decimal es mayor que 0.
- 25 7.- Mezcla de reacción según la reivindicación 6, comprendiendo la disolución hidrófoba orgánica un ácido graso con más de 12 átomos de carbono o un éster del mismo, preferentemente ácido oleico, ácido erúrico o laurato de metilo.
- 30 8.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 o 2, empleo según una de las reivindicaciones 3 o 4, o mezcla de reacción según una de las reivindicaciones 6 o 7, tratándose, en el caso de la célula metabólicamente activa, de una célula que presenta una transaminasa, preferentemente además al menos una enzima del grupo que comprende alcohol deshidrogenasa, alanina deshidrogenasa y lactama hidrolasa.
- 9.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1, 2 y 8, empleo según una de las reivindicaciones 3 o 4, o mezcla de reacción según una de las reivindicaciones 6 o 7, constituyendo la disolución hidrófoba orgánica al menos un 5, preferentemente al menos un 20 por ciento del volumen total de disolución hidrófoba orgánica y medio de cultivo acuoso.
- 35 10.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1, 2, 8 y 9, empleo según una de las reivindicaciones 3 o 4, o mezcla de reacción según una de las reivindicaciones 6 o 7, situándose el valor de pH del medio de cultivo acuoso entre 5 y 9 en el momento de la puesta en contacto.



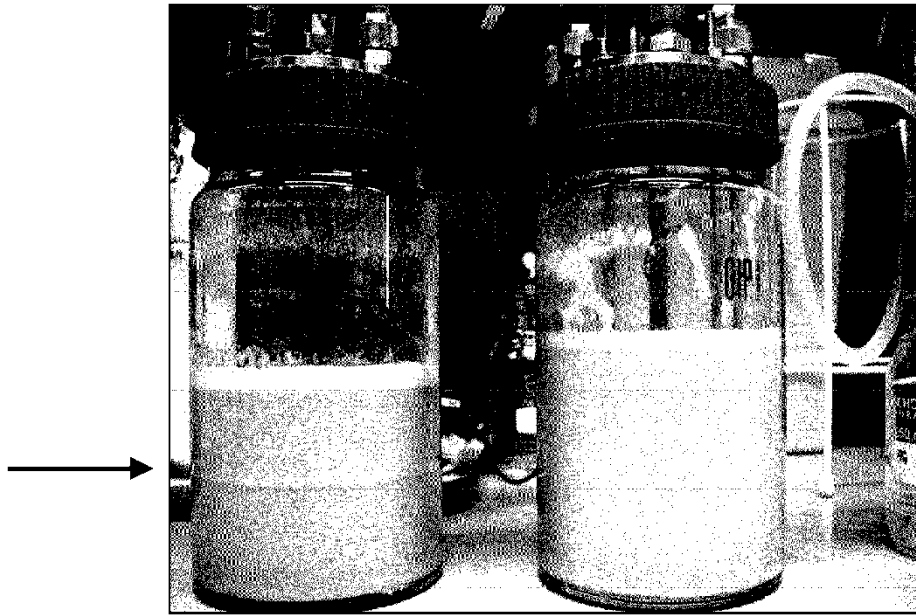


Fig. 1



**Fig. 2**

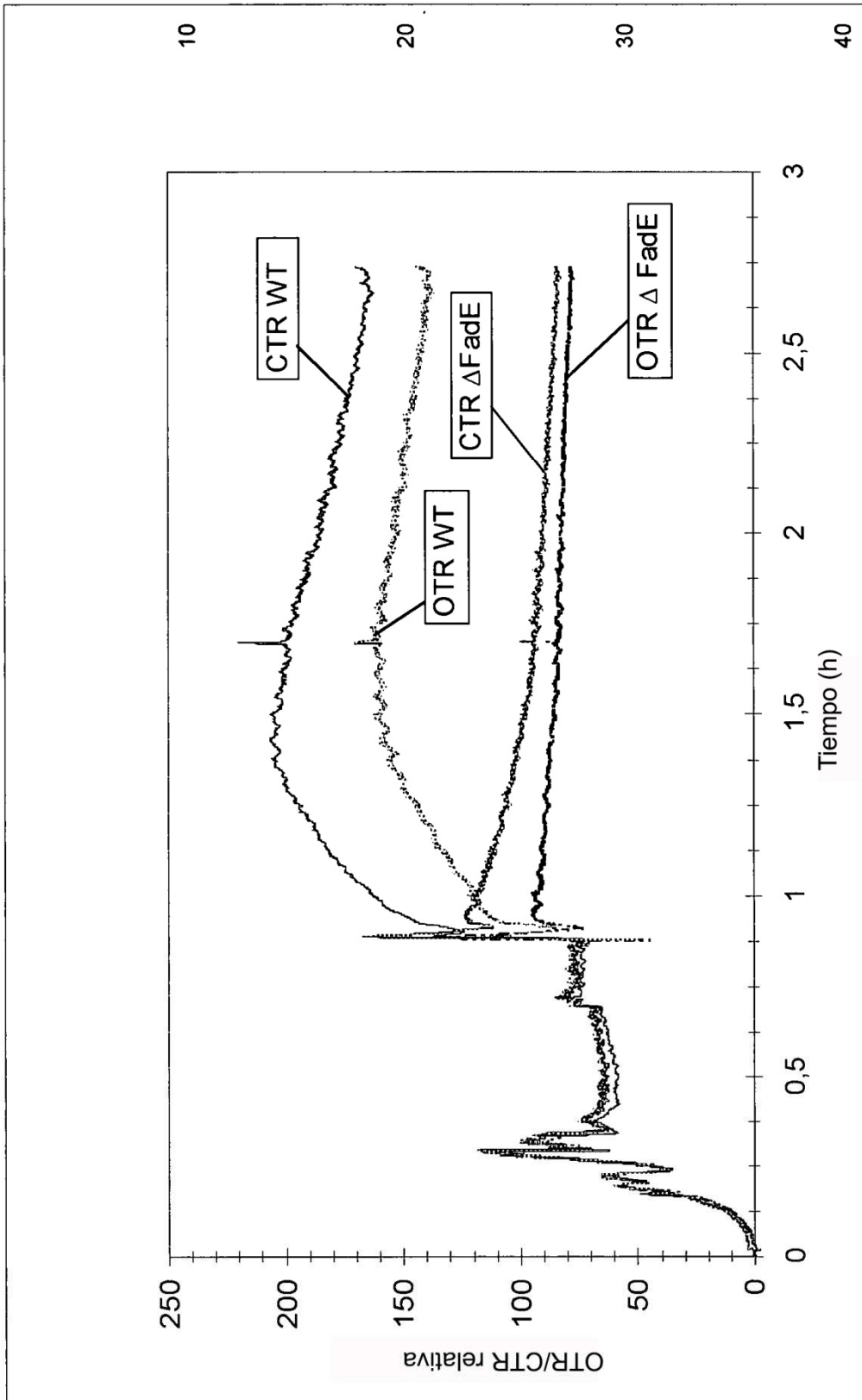
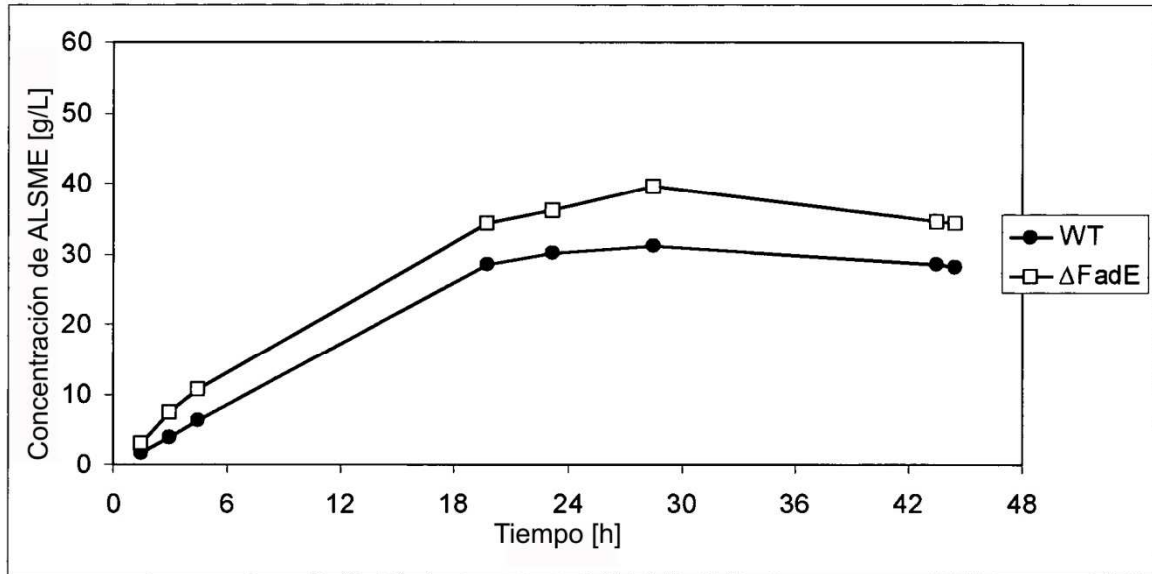
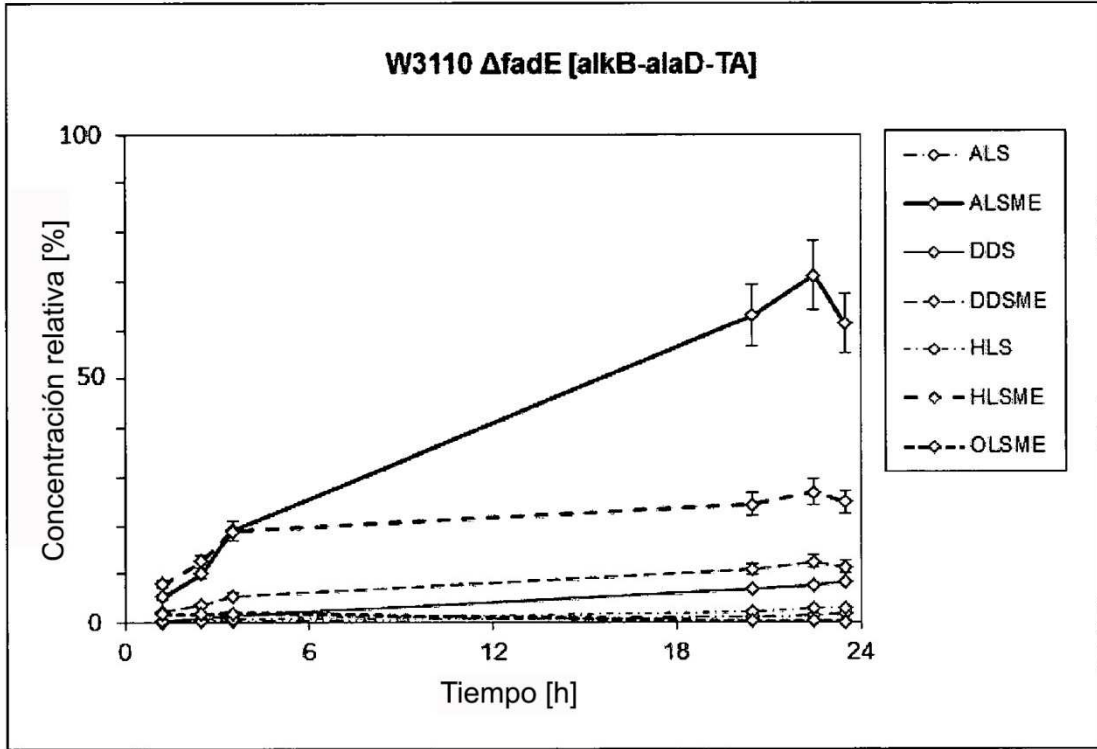
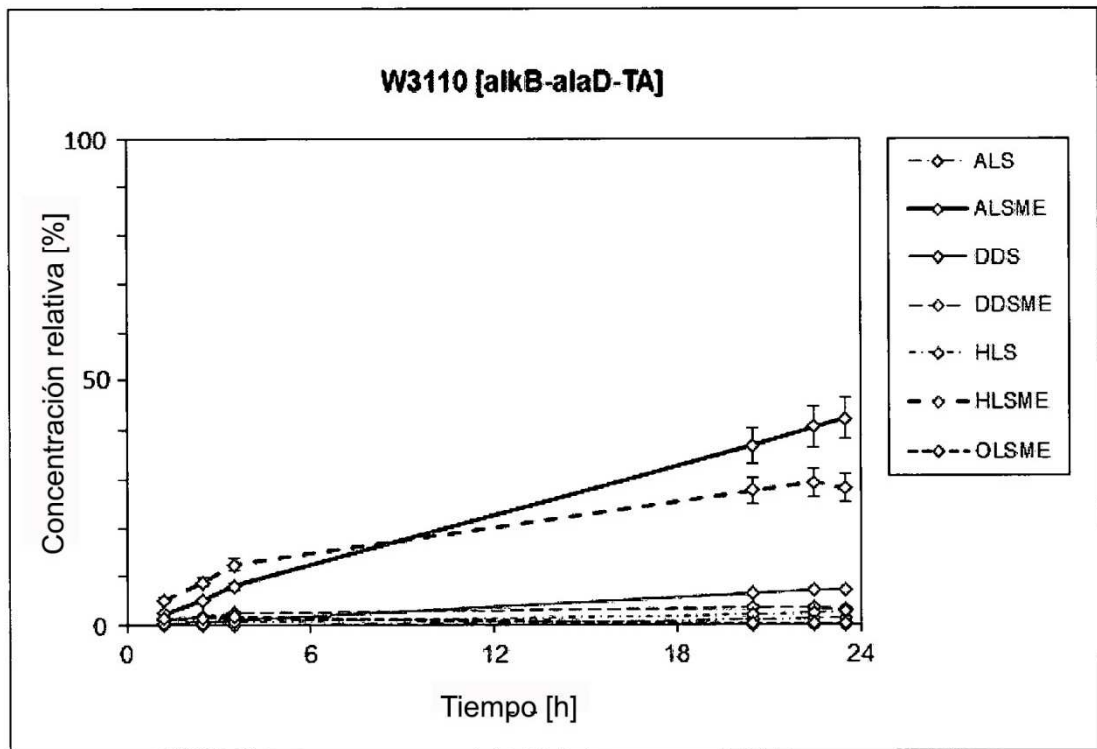


Fig. 3

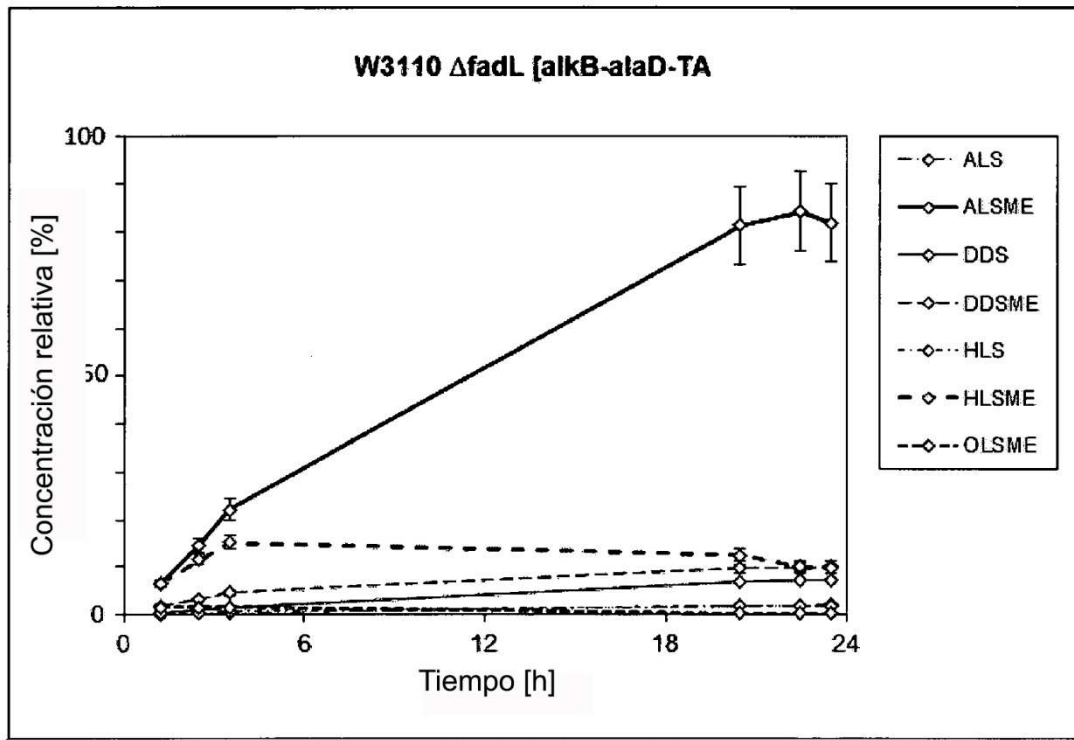
**Fig. 4**



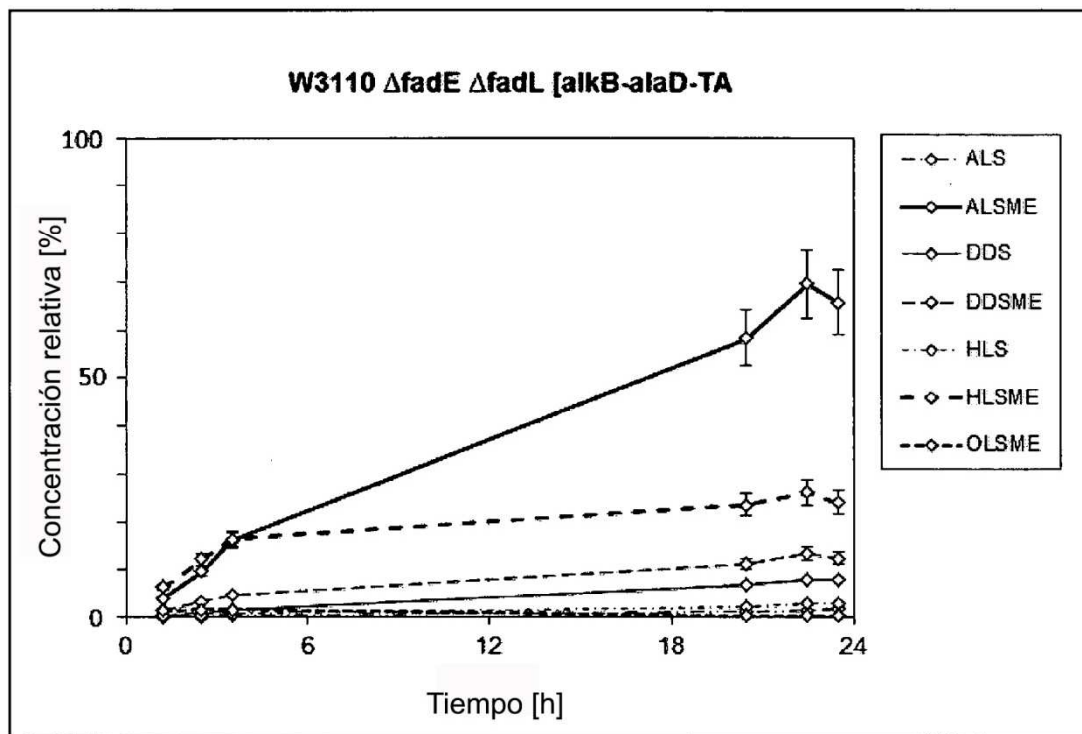
**Fig. 5a**



**Fig. 5b**



**Fig. 5c**



**Fig. 5d**

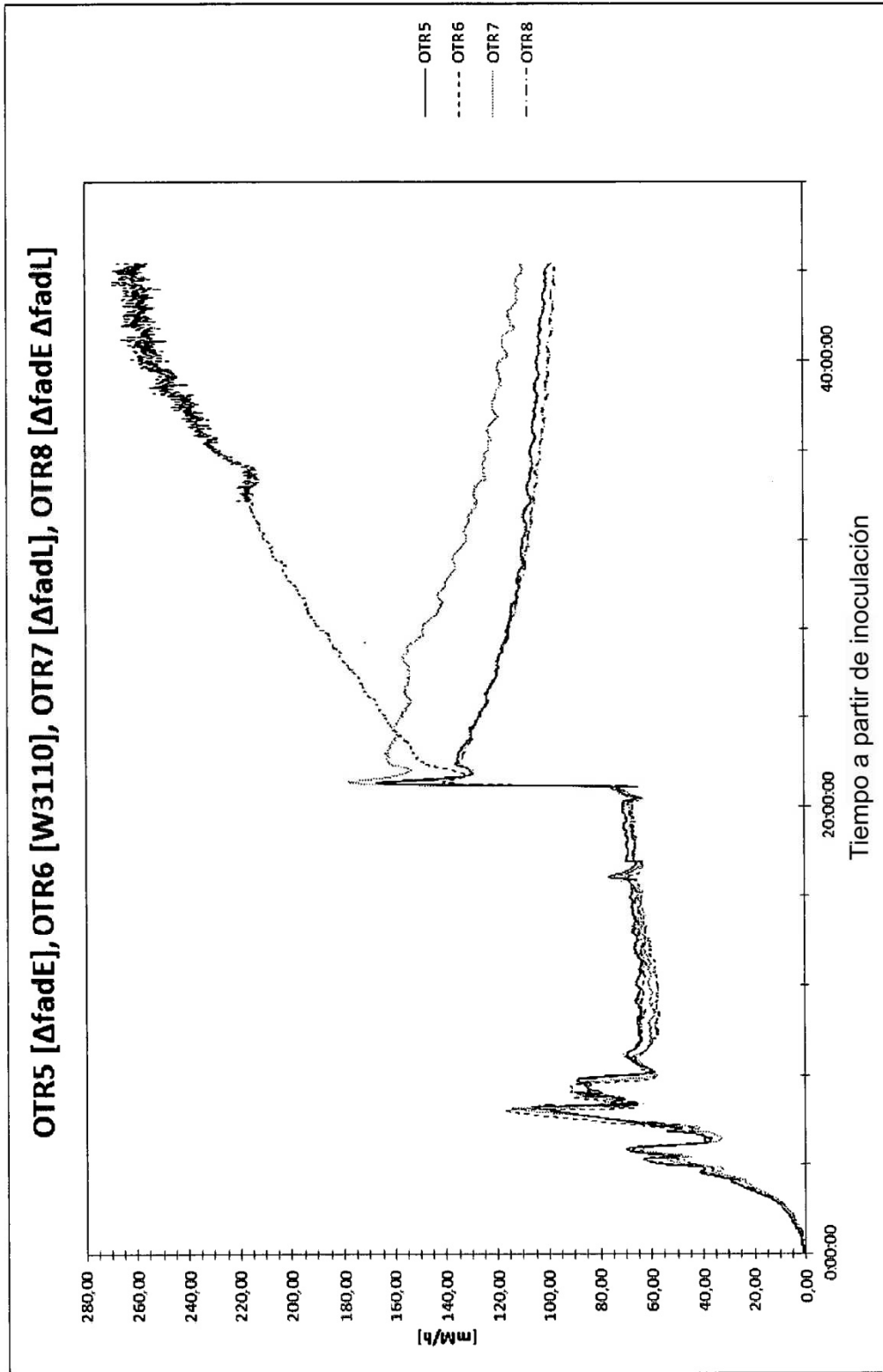


Fig. 6a

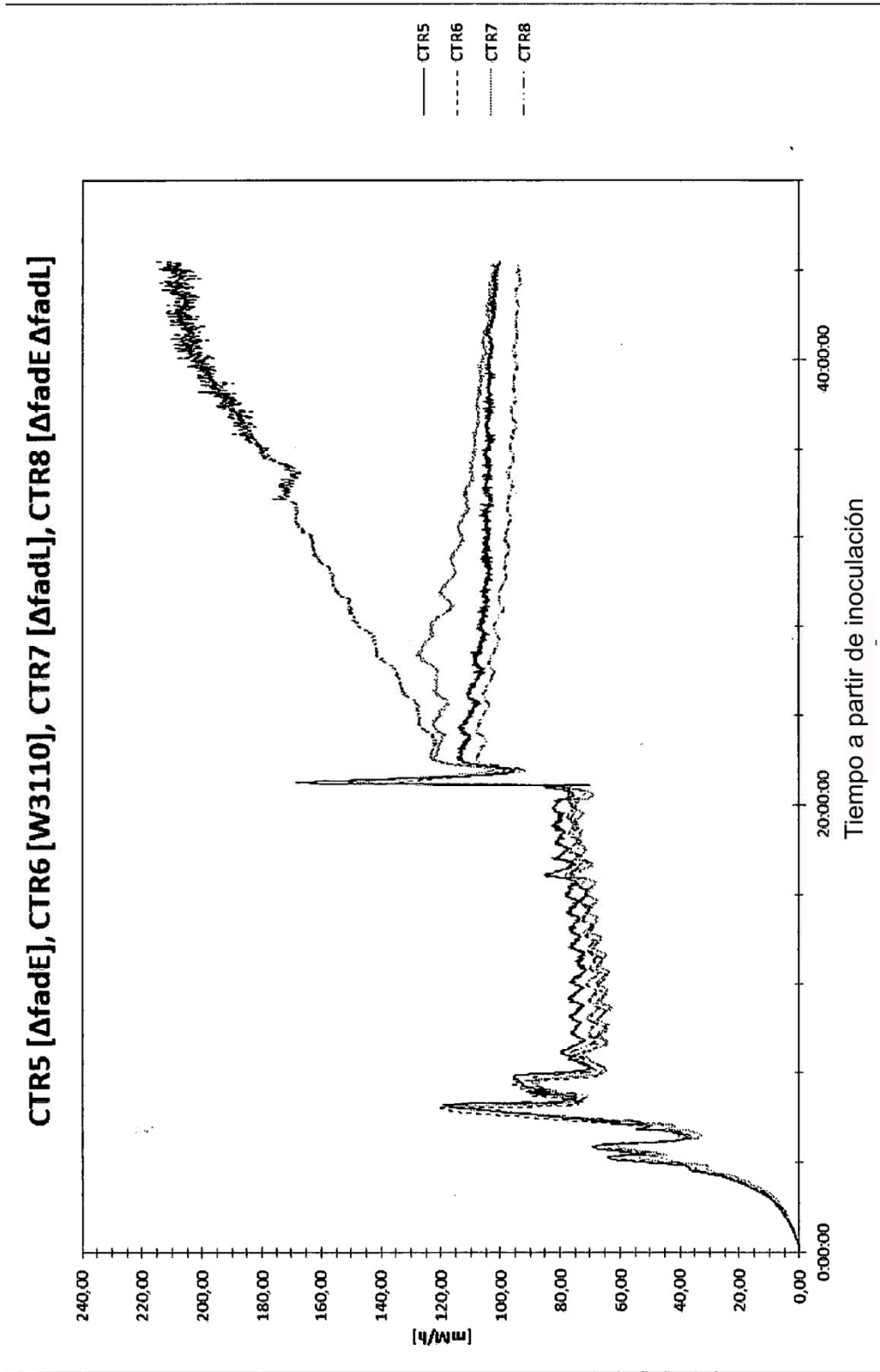


Fig. 6b



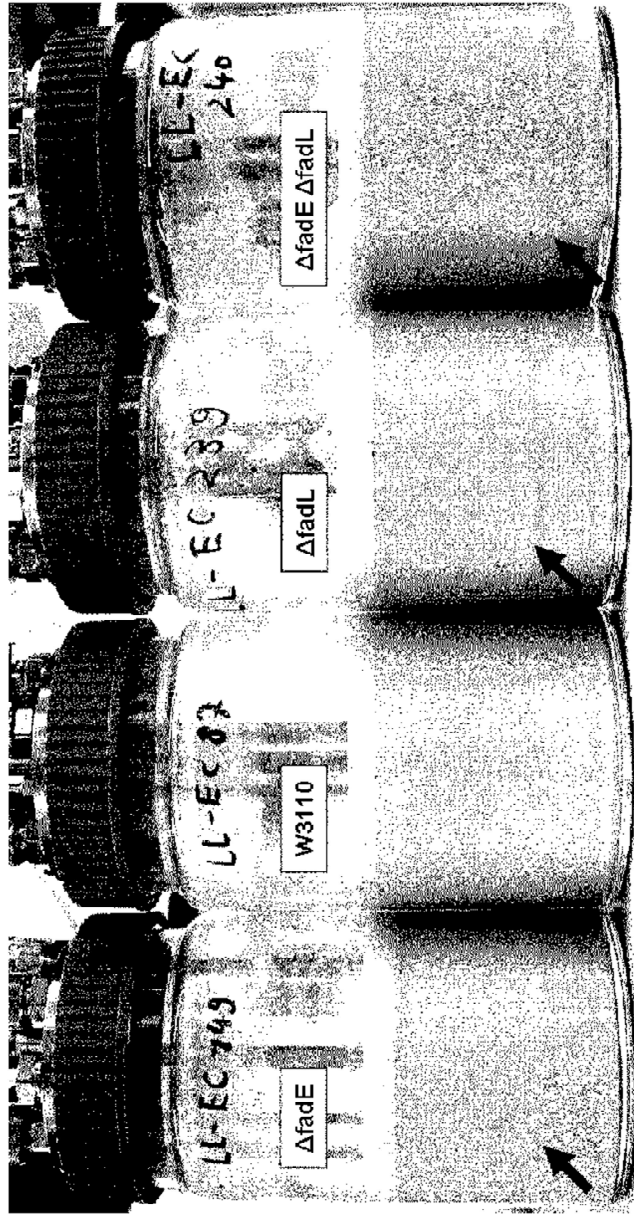


Fig. 7