(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 692 950**

(51) Int. CI.:

C12P 7/64 (2006.01)
C07C 55/20 (2006.01)
C07C 59/147 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.09.2013 PCT/EP2013/068144**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **13.03.2014 WO14037328**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.09.2013 E 13758836 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.08.2018 EP 2893026**

(54) Título: **Procedimiento de preparación de ácido sebácico**

(30) Prioridad:

07.09.2012 EP 12183534

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.12.2018

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

PIATESI, ANDREA;
BALDENIUS, KAI-UWE;
DITRICH, KLAUS;
KINDLER, ALOIS;
ZAJACZKOWSKI-FISCHER, MARTA;
BÖHLING, RALF y
REHFINGER, ALWIN

(74) Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

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 de preparación de ácido sebácico

La presente invención se refiere a un procedimiento nuevo de preparación de ácido sebácico. En especial, esta invención se refiere a la producción quimioenzimática de ácido sebácico que comienza a partir de ácido linoleico que es hidroxilado a ácido 10-hidroxi-12-octadecenoico y se transforma, además, en ácido sebácico.

Estado de la técnica

El ácido sebácico se produce actualmente a partir de aceite de castor mediante corte alcalino de ácido ricinoleico (ácido 12-hidroxi-9-cis-octadecenoico) bajo presión y altas temperaturas.

El ácido sebácico y sus derivados son componentes importantes en polímeros biodegradables, plastificantes, lubricantes, fluidos hidráulicos, velas y cosméticos.

Un resumen de la oxidación microbiana de ácidos grasos insaturados se describe en la siguiente publicación: Hou C.T. (1995) Adv. Appl. Microbiol., 41, 1-23.

La hidratación enzimática de ácido linoleico en ácido 10-hidroxi-12-octadecenoico mediante una preparación de pseudomonas se describe con un rendimiento del 57 % por Schroepfer G.J. et al. (1970) J. Biol. Chem., 245, 3798-3801).

En el documento US 4,582,804, Litchfield & Pierce divulgan que células de *Rhodococcus rhodochrous* catalizan la hidratación de ácido linoleico en ácido 10-hidroxi-12-octadecenoico con un rendimiento del 22 %.

Hou informa la hidratación de ácido linoleico en ácido 10-hidroxi-12-octadecenoico mediante el sistema de enzima de *Flavobacterium DS5* con un rendimiento del 55 % (Hou C.T. (1994) J. Am. Oil Chem. Soc., 71, 975-978).

La misma conversión se ha demostrado también usando cepas de *Enterococcus faecalis* a partir de rumen ovino con un rendimiento del 22 % (Hudson J.A. et al. (1998) FEMS Microbiology Letters, 169, 277-282).

Un informe de Demir et al. describe la conversión quimioenzimática de ácido linoleico en ácido cis-9,trans-11-octadecadienoico (CLA), un compuesto que tiene propiedades anticancerígenas, supresoras de hipertensión y reductoras de grasa. El ácido linoleico se convirtió en ácido 10-hidroxi-12-octadecenoico mediante *Lactobacillus plantarum*, lo que siguió con un tratamiento con yodo bajo radiación de microondas para producir CLA con alto rendimiento (Demir A.S. et al. (2010) J. Agric. Food Chem., 58, 1646-1652).

A pesar de que de muchos informes han descrito el uso de microorganismos enteros o extractos celulares para la hidratación de ácidos grasos insaturados, ninguna enzima se ha caracterizado en detalle hasta 2009. Bevers et al. describe, en primer lugar, el aislamiento, expresión recombinante en E. coli y caracterización de la oleato hidratasa (EC 4.2.1.53) a partir de *Elizabethkingia meningoseptica* (Bevers L.E. et al. (2009) J. Bacteriol., 191, 5010-5012).

Un procedimiento para la producción de ácidos grasos hidroxilados mediante el uso de una hidratasa a partir de *Streptococcus pyogenes* se describió en WO 2008/119735.

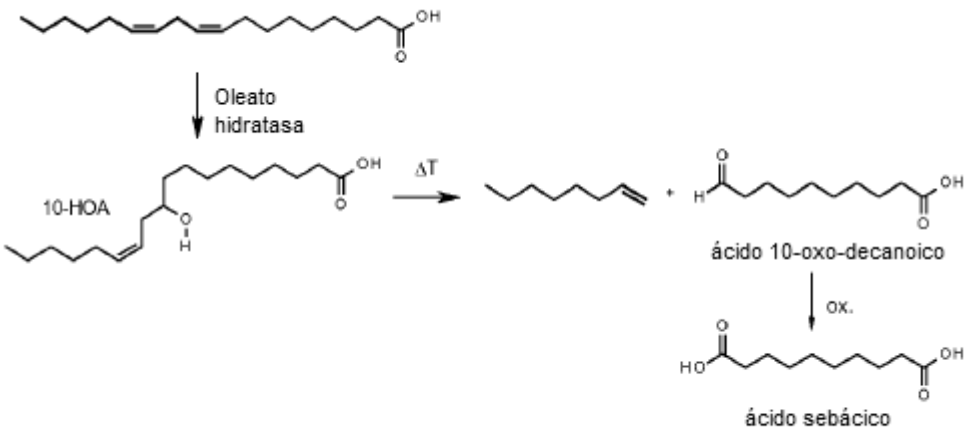
Informes recientes mostraron que una oleato hidratasa a partir de *Stenotrophomonas maltophilia* y a partir de *Lysinibacillus fusiformis* resulta capaz de hidratar ácido linoleico, a pesar de su capacidad específica reducida en comparación con el ácido oleico (Young-Chul Joo et al. (2012) J. Biotechnol., 158, 17-23 and Bi-Na Kim et al. (2011) Appl. Microbiol. Biotechnol., en línea).

Objetivo

Debido a la demanda creciente de ácido sebácico, un objeto de la presente invención consiste, por lo tanto, en proporcionar una ruta nueva para la síntesis de ácido sebácico que comienza a partir de eductos distintos del ácido ricinoleico a los que puede acceder fácilmente.

Objeto de la invención

El objeto se alcanza de acuerdo con las reivindicaciones mediante un procedimiento de preparación de ácido sebácico al hacer reaccionar en una primera etapa (i) ácido linoleico con agua, catalizado por una oleato hidratasa para formar ácido 10-hidroxi-12-octadecenoico, en una segunda etapa (ii) pirolizar el ácido 10-hidroxi-12-octadecenoico en 1-octeno y ácido 10-oxo-decanoico y en una tercera etapa (iii) oxidar el ácido 10-oxo-decanoico en ácido sebácico.



Etapa (i)

El procedimiento de acuerdo con la invención comienza con la conversión de ácido linoleico en ácido 10-hidroxi-12-octadecenoico. Para la etapa (i) del procedimiento inventivo, se puede usar ácido linoleico químicamente puro así como también sustratos que contienen ácido linoleico como un componente principal, preferiblemente, más del 60 %, más preferiblemente, más del 70 % u 80 % en peso del sustrato.

Tales sustratos se pueden preparar a partir de aceite que tiene un alto contenido de ácido linoleico en forma de ésteres de glicerol mediante hidrólisis del éster de glicerol y recuperación de ácido linoleico en forma del ácido libre o sus sales. Tales aceites son, por ejemplo, aceite de cártamo (78 % de ácido linoleico), aceite de semilla de uva (73 % de ácido linoleico), aceite de semilla de amapola (70 % de ácido linoleico) o, de mayor preferencia, aceite de girasol (68 % de ácido linoleico).

Si el ácido linoleico se produce a partir de un aceite complejo, tal como aceite de girasol, la preparación de ácido graso puede contener, además de ácido linoleico, otros ácidos grasos que pueden presentarse cuando se lleva a cabo la etapa (i) de la reacción inventiva. Estos otros ácidos grasos pueden eliminarse a partir de la reacción en etapas de reacción posteriores, preferiblemente después de la etapa (ii).

Como enzimas adecuadas para la etapa (i) existen numerosas oleato hidratasas en el estado de la técnica anterior según se describe anteriormente, por ejemplo, a partir de los organismos *Pseudomonas, Rhodoccocus, Flavobacterium, Enterococcus, Lysinibacillus, Lactobacillus, Stenotrophomonas, Elizabethkingia*.

Estas enzimas se conocen en el estado de la técnica para convertir ácido linoleico en ácido 10-hidroxi-12-octadecenoico. Además de estas enzimas, otras oleato hidratasas pueden encontrarse fácilmente por la persona capacitada mediante exploración de microorganismos usando como una reacción modelo, la conversión de ácido oleico en ácido 10-hidroxiesteárico o la reacción específica de ácido linoleico en ácido 10-hidroxi-12-octadecenoico. Esta reacción puede llevarse a cabo en ensayos de tubos de prueba y, de esta manera, miles de microorganismos se pueden explorar simultáneamente en poco tiempo.

Como la secuencia de algunas oleato hidratasas se conoce, resulta posible también la exploración in silico de genoma de microorganismos para otras oleato hidratasas y comprobar las poblaciones positivas para la conversión de ácido oleico en ácido 10-hidroxiesteárico o la reacción específica de ácido linoleico en ácido 10-hidroxi-12-octadecenoico.

Otra forma consiste en ingeniería genética de oleato hidratasas que se conocen con el fin de obtener enzimas con actividad mejorada o mejor temperatura o resistencia a solvente mediante la comparación de las secuencias a partir de oleato hidratasas que se conocen con el fin de detectar regiones homólogas o conservadas y de encontrar puntos de partida para una mutagénesis de gen dirigida.

Una enzima preferida es la oleato hidratasa de acuerdo con EC 4.2.1.53. Un representante de esta clase de enzimas es la enzima a partir de *Elizabethkingia miningoseptica* (Bevers et al (2009) J. Bacteriol. 191, 5010-5012). La secuencia de nucleótidos y la secuencia correspondiente de aminoácidos se divulgan como SEQ ID NO:1 y 2.

Una enzima preferida es una que tiene SEQ ID NO:2, o un fragmento de dicha secuencia de polipéptidos, en la que dicho fragmento resulta suficiente para una proteína que tiene la actividad enzimática de una oleato hidratasa, o secuencias de ácido nucleico que comprenden una secuencia de nucleótidos con códigos para una oleato hidratasa y que se hibridan con una cepa complementaria de la secuencia de nucleótidos que codifica para SEQ ID NO:2 en condiciones rigurosas, o que comprende un fragmento de dicha secuencia de nucleótidos, en la que el fragmento

resulta suficiente para codificar una proteína que tiene la actividad enzimática de una oleato hidratasa. La enzima puede ser una enzima que tiene la actividad enzimática de una oleato hidratasa y la secuencia de aminoácidos que se representa en SEQ ID NO:2 o una secuencia de aminoácidos que resulta en, al menos el 75 % u 80 %, preferiblemente, al menos, el 85 %, 90 % o 95 %, más preferiblemente, al menos, el 95 % o 97 % y de mayor preferencia, al menos, el 98 % o 99 %, idéntica con respecto a la secuencia de aminoácidos que se representa en SEQ ID NO:2.

Para mejorar la solubilidad de enzima y nivel de expresión, tales enzimas puede expresarse de manera recombinante con pares de fusión N-(o C)-terminales (proteína o polipéptido). Las proteínas comunes o marcajes que se usan como pares de fusión para solubilidad y/o niveles de expresión mejorados son: proteína de unión a maltosa, tiorredoxina, proteína fluorescente verde, glutatión-S-transferasa, disulfuro oxidoreductasa/isomerasa, marcaje T7, marcaje SET, Nus A, Mistic y SUMO.

En el contexto de esta invención, el término “hibridación en condiciones rigurosas” se refiere a que la hibridación se lleva a cabo in vitro en condiciones lo suficientemente rigurosas como para asegurar una hibridación específica. Las condiciones rigurosas de hibridación in vitro se conocen por la persona capacitada en el estado de la técnica, y pueden encontrarse en la literatura (por ejemplo, Sambrook and Rus-sell (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ra edición, Cold Spring Har-bour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY). El término “hibridación específica” se refiere al hecho de que una molécula se une preferiblemente a una cierta secuencia de ácido nucleico, la secuencia específica, en condiciones rigurosas, si la secuencia específica es parte de una mezcla compleja de, por ejemplo, moléculas de ADN o ARN, pero no se une, o, al menos en un grado considerablemente menor, a otras secuencias.

Las condiciones rigurosas dependen de las circunstancias. Las secuencias más largas hibridan específicamente a temperaturas más altas. De manera general, las condiciones rigurosas se seleccionan de manera tal que la temperatura de hibridación se encuentra, aproximadamente, por debajo de 5 ºC con respecto al punto de fusión (Tm) para la secuencia específica con una fuerza iónica definida y un valor de pH definido. Tm es la temperatura (con un valor de pH definido, una fuerza iónica definida y una concentración de ácido nucleico definida) en la que el 50 % de las moléculas complementarias con respecto a la secuencia específica hibridan con la secuencia específica en el estado de equilibrio. Comúnmente, las condiciones rigurosas son aquellas en las que la concentración de sal es, al menos, de alrededor de 0,01 a 1,0 M de la concentración de ion sodio (o la concentración de otra sal) a un pH de entre 7,0 y 8,3 y la temperatura es de, al menos, 30 ºC para moléculas cortas (a saber, por ejemplo, de 10 a 50 nucleótidos). Además, las condiciones rigurosas pueden comprender la adición de agentes, tales como formamida, que desestabiliza los híbridos. En la hibridación en condiciones rigurosas según se usa en la presente, las secuencias de nucleótidos que resultan homólogas unas con respecto a las otras en, al menos, el 60 %, permanecen normalmente hibridas unas con respecto a las otras. Preferiblemente, las condiciones rigurosas se seleccionan de manera tal que las secuencias que resultan homólogas unas con respecto a las otras en, al menos, alrededor del 65 %, preferiblemente, al menos, alrededor del 70 %, y especialmente preferible, al menos, alrededor del 75 %, o más, permanecen normalmente hibridas unas con respecto a las otras. Un ejemplo preferido, no limitante, de las condiciones de hibridación rigurosas consiste en hibridaciones en 6 x cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45 ºC, seguidas de una o más etapas de lavado en 0,2 x SSC, SDS al 0,1 % de 50 a 65 ºC. Los rangos de temperatura, por ejemplo, en condiciones de hibridación estándares en base al tipo de ácido nucleico, se encuentran entre 42 ºC y 58 ºC en un regulador acuoso a una concentración de 0,1 a 5 x SSC (pH 7,2).

Si un solvente orgánico, por ejemplo, formamida al 50 % se presenta en el regulador antes mencionado, la temperatura en condiciones estándares es de alrededor de 42 ºC. Preferiblemente, las condiciones de hibridación para híbridos ADN:ADN son por ejemplo 0,1 x SSC y 20 ºC a 45 ºC, preferiblemente, 30 ºC a 45 ºC. Preferiblemente, las condiciones de hibridación para híbridos ADN:ARN son, por ejemplo, 0,1 x SSC y 30 ºC a 55 ºC, preferiblemente, entre 45 ºC a 55 ºC. Las temperaturas de hibridación que se mencionan anteriormente se determinan, por ejemplo, para un ácido nucleico que tiene una longitud de aproximadamente 100 pares base y un contenido G/C del 50 % en la ausencia de formamida. La persona capacitada en el estado de la técnica conoce como se pueden determinar las condiciones de hibridación requeridas usando los libros antes mencionados o los siguientes: Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N. Y. (1989), Hames und Higgins (editor) 1985, Nucleic Acids Hybridization: A Practical Approach, IRL Press en Oxford University Press, Oxford; Brown (editor) 1991, Essential Molecular Biology: A Practical Approach, IRL Press en Oxford University Press, Oxford.

La estereoespecificidad de la hidratación enzimática no resulta esencial para el procedimiento inventivo. Por consiguiente, tanto el ácido 10(R) o el 10(S)-hidroxi-12-octadecenoico o mezclas (racematos) que se producen en la etapa (i) pueden usarse en la etapa (ii) siguiente.

La conversión enzimática de ácido linoleico en ácido 10-hidroxi-12-octadecenoico puede llevarse a cabo en un medio de reacción que contiene el ácido linoleico y agua. Si el ácido linoleico se usa en la forma del ácido libre (la fase aceitosa), el agua o una solución que contiene agua regulada con la enzima forma una segunda fase líquida (la fase acuosa). Las dos fases líquidas deberían mezclarse meticulosamente con el fin de formar una emulsión para una reacción rápida.

Sin embargo, la etapa (ii) puede llevarse a cabo también con enzimas inmovilizadas, que pueden retirarse fácilmente a partir del medio de reacción y reciclarse. Las enzimas pueden inmovilizarse, de manera general, mediante diferentes procedimientos tales como adsorción, unión covalente, encapsulación con membrana, encapsulación con gel y reticulación. Las propiedades del material transportador para inmovilización deben optimizarse con el fin de evitar inactivación de enzima. Transportadores comunes pueden ser materiales tanto orgánicos (naturales y no naturales) como inorgánicos. Los materiales inorgánicos tienen normalmente buena tolerancia con respecto a la presión, mientras que los materiales orgánicos muestran buena estabilidad química. Los transportadores inorgánicos son comúnmente materiales porosos que se basan en óxidos de silicona o aluminio, o mezclas de estos. Los transportadores orgánicos naturales son, por ejemplo, polisacáridos como celulosa, almidón, dextrano, agar o quitina. Las proteínas como colágeno, gelatina o albúmina pueden usarse también. Los transportadores orgánicos sintéticos incluyen poli(meta)acrilatos, poliacrilamida, polímeros de vinilo y alilo, poliésteres, poliamidas.

La etapa (i) puede llevarse a cabo en un sistema de 2 fases, donde la preparación de enzima (fase acuosa) se agrega a la fase orgánica que contiene ácido linoleico. La proporción fase acuosa/fase ácido linoleico puede variar en un amplio rango.

La reacción puede llevarse a cabo con o sin solventes adicionales. Con respecto a la selección del solvente, la persona capacitada en el estado de la técnica se guía conforme al rendimiento del producto, la velocidad de reacción, la capacidad de manejo de las suspensiones que se forman y el coste del solvente.

Solventes ventajosos son aquellos que pueden mezclarse con el ácido linoleico, son inertes químicamente, a saber, no reaccionan con la enzima o inhiben la actividad enzimática.

Entre los solventes orgánicos comunes en procedimientos biocatalíticos se incluyen: hexano, heptano, dodecano, hexadecano, éter etílico, éter isopropílico, éter butílico, tetrahidrofurano, dioxano, tolueno, dimetilsulfóxido, acetona, 2-pentanona, 2-heptanona. La temperatura de reacción para la etapa (i) depende de la estabilidad térmica de la enzima que se usa y se encuentra normalmente entre 10 y 50 ºC, preferiblemente, entre 20 y 40 ºC. Sin embargo, si se usa una enzima con una estabilidad térmica alta, las temperaturas de reacción por encima de 50 ºC son posibles también.

El ácido 10-hidroxi-12-octadecenoico que se forma puede recuperarse a partir del medio de reacción mediante procedimientos convenciones tales como cristalización o extracción.

Para la próxima etapa de la reacción inventiva, a saber, la etapa (ii), el ácido 10-hidroxi-12-octadecenoico puede usarse en la forma del ácido libre o en la forma de un éster, preferiblemente un éster alquílico más bajo, tal como éster metílico o etílico del ácido 10-hidroxi-12-octadecenoico.

Si debe usarse un éster del ácido 10-hidroxi-12-octadecenoico en la reacción, el ácido 10-hidroxi-12-octadecenoico que se recupera a partir de la etapa (i) puede esterificarse mediante procedimientos químicos o enzimáticos antes de la pirólisis de la etapa (ii). Una manera preferida para la esterificación consiste en la conversión enzimática mediante una lipasa.

Etapa (ii)

Para la descripción de esta etapa (ii), el término “ácido 10-hidroxi-12-octadecenoico” deberá referirse a tanto el ácido 10-hidroxi-12-octadecenoico libre como a un éster del ácido 10-hidroxi-12-octadecenoico, por ejemplo, un éster metílico o etílico del ácido 10-hidroxi-12-octadecenoico.

La pirólisis del ácido 10-hidroxi-12-octadecenoico en ácido 10-oxo-decanoico es una reacción de tipo retro-eno. Con el fin de seleccionar para la redisposición de retro-eno y de suprimir la reacción de deshidratación competidora, la mejor opción consiste en tener una vaporización veloz del ácido 10-hidroxi-12-octadecenoico.

La reacción puede llevarse a cabo a temperaturas a partir de por encima de 400 hasta 800 ºC, preferiblemente a partir de 500 a 600 ºC. El rango de temperaturas óptimo depende del tiempo de residencia del sustrato así como también de la naturaleza del sustrato. Si se usa un éster metílico del ácido 10-hidroxi-12-octadecenoico, los mejores resultados se han alcanzado con temperaturas de 600 ºC y un tiempo de residencia de 1 - 2 segundos en una microrreactor. Si se usa el ácido libre de ácido 10-hidroxi-12-octadecenoico, en lugar del éster, se podría detectar una conversión completa del ácido 10-hidroxi-12-octadecenoico a temperaturas más bajas, tal como a 575 ºC. Sin embargo, la selectividad para la reacción retro-eno en cuanto a la deshidratación resulta menor con el ácido libre de ácido 10-hidroxi-12-octadecenoico en comparación con el éster metílico del ácido 10-hidroxi-12-octadecenoico. Para detalles compárense los ejemplos de trabajo.

La reacción puede llevarse a cabo en un mili o microrreactor, por ejemplo, un capilar con un diámetro de 0,1 a 3 mm. Aspectos cruciales incluyen una alta tasa de calentamiento y una vaporización rápida en un mili o microevaporador con tiempos de residencia de <10 segundos, preferiblemente, de <1 segundo. Con el fin de mantener estas características, los aparatos mili o microestructurados que se conocen por aquellos capacitados en el estado de la técnica resultan adecuados. La reacción puede llevarse a cabo con o sin un solvente. Si se usa un solvente, el solvente puede agregarse hasta en un 99 % (w/w). El solvente que se usa no debería reaccionar o descomponerse

a las temperaturas y condiciones que se usan durante la pirólisis. Un solvente preferido se elige a partir del grupo de ésteres estables, tales como THF o dioxano. THF es el solvente de mayor preferencia para la etapa (ii).

Se puede agregar, además, agua a la mezcla de reacción.

El ácido 10-oxo-decanoico que se forma en la etapa (ii) puede depender del ácido 10-hidroxi-12-octadecenoico de material de partida, tanto del ácido 10-oxo-decanoico libre como del éster correspondiente del ácido 10-oxo-decanoico. Para la descripción de esta etapa (ii), el término “ácido 10-oxo-decanoico” deberá referirse al ácido libre así como también al éster del ácido 10-oxo-decanoico.

El ácido 10-oxo-decanoico puede separarse a partir del segundo producto de la redisposición de reto-eno (1-octeno) mediante procedimientos convencionales, tales como destilación o extracción. En el caso de un ácido linoleico no puro como material de partida, por ejemplo, hidrolizados de aceite de girasol, los ácidos grasos no transformados (por ejemplo, ácido esteárico o ácido 10-hidroxiestéarico) pueden retirarse mediante procedimientos convencionales, tales como destilación, cristalización o extracción.

Para la próxima etapa, la oxidación del ácido 10-oxo-decanoico en ácido sebácico, la mezcla de producto de la etapa (ii) que consiste de ácido 10-oxo-decanoico, 1-octeno, y posiblemente, otros ácidos grasos, puede tomarse, de manera general, sin purificación intermedia o el ácido 10-oxo-decanoico puede purificarse mediante los procedimientos anteriormente mencionados. Tanto el éster de metilo como el ácido graso libre pueden usarse.

Etapa (iii)

Para la etapa (iii) el ácido 10-oxo-decanoico recuperado puede usarse en la forma del ácido libre o el éster.

La oxidación de la función aldehído en el ácido 10-oxo-decanoico para formar ácido dicarboxílico, ácido sebácico puede llevarse a cabo de acuerdo con procedimientos bien conocidos, como, por ejemplo, en la oxidación de oxo-aldehídos para formar oxo-ácidos carboxílicos, mediante el uso de agentes de oxidación suaves como oxígeno o aire hasta 100 ºC y hasta 7 bar, ya sea sin catalizador o catalizados de manera homogénea mediante metales activos redox como por ejemplo Cu, Fe, Co, Mn, etc. (Industrial Organic Chemistry, Wiley-VCH, H.-J. Arpe (editor), 2007, pp.

En base a la pureza del material de partida que se usa como fuente de ácido linoleico en la etapa (i) y en base a la aplicación del ácido sebácico, podría ser necesario contar con purificación adicional y etapas de recupero en el procedimiento de acuerdo con la invención que se conocen bien per se por la persona capacitada en el estado de la técnica. Cuando se usa el éster del ácido 10-oxo-decanoico en la etapa (iii), la hidrólisis del éster conducirá al ácido sebácico libre.

Ejemplos de trabajo

Ejemplo 1

Expresión y caracterización de una oleato hidratasa

El gen que codifica la oleato hidratasa a partir de *Elizabethkingia meningoseptica* se ha sintetizado con uso de un codón que se optimiza para *E. coli*. El siguiente procedimiento de producción se adaptó a partir de Bevers et al. (Bevers L.E. et al. (2009) J. Bacteriol., 191, 5010-5012).

Para la producción de enzima recombinante, el gen se clonó en el vector pBAD(HisA) (Invitrogen), que permite inducción de expresión con arabinosa. Una medida de TOP10 de E. coli (Invitrogen) se transformó con pBAD(HisA)-OH y se colocó en placas de LB-Agar-Amp (durante la noche, a 37 ºC). Una sola colonia se inoculó en 2xYT-Amp y se cultivó durante 5 h adicionales a 37 ºC.

La inducción de expresión de proteína se alcanzó mediante el agregado de 5 ml de este cultivo a 500 ml de 2xYT-Amp complementado con arabinosa al 0,2 % y mediante incubación a 37 ºC durante 18 h adicionales. Después de la inducción, las células se recolectaron mediante centrifugación (20’, 4000 rpm, 4 ºC) y se resuspendieron en Tris-HCl 20 mM (pH 8), NaCl 50 mM y $CaCl_2$ 1mM.

La suspensión de células se sometió a ultrasonido (3’, 15’’ ciclos encendido/apagado, 80 % de amplitud a 4 ºC) y el sobrenadante limpio se usó en la mayoría de las conversiones biocatalíticas que se describen en este informe (comúnmente 40 mg/ml de proteína total; ≈13 % de oleato hidratasa sobre la base de Agilent 2100 Bioanalyzer). La enzima se ha purificado, además, mediante cromatografía de afinidad por Ni (purificación Histag). En este caso, las células inducidas se resuspendieron en Tris-HCl 20 mM (pH 8), NaCl 50 mM y $CaCl_2$ 1mM e imidazol 10 mM. El regulador de lavado durante la purificación contenía imidazol 20 mM y la elución de proteína se alcanzó con 500 mM en el mismo regulador. Las fracciones que contenían oleato hidratasa se recolectaron y se dializaron contra Tris-HCl 20 mM (pH 8), NaCl 50 mM y $CaCl_2$ 1 mM. La solución de material de enzimas (5,8 mg/ml) se almacenó a 4 ºC.

La identidad de la proteína expresada se ha confirmado, además, mediante una secuenciación de proteína N-terminal.

Ejemplo 2

Conversión de ácido oleico en ácido 10-hidroxi-esteárico (10-HSA)

Como una primera etapa la oleato hidratasa que se produce de manera recombinante del Ejemplo 1 se caracterizó por su actividad de tipo silvestre en ácido oleico (OA) para producir ácido 10-hidroxi-esteárico (10-HSA). La bacteria que expresa la oleato hidratasa se ha sometido a ultrasonido según se describe en el ejemplo 1 y se agregaron 200 µl del sobrenadante limpio (5mg/ml de contenido de proteína total, ≈ 600 µg de oleato hidratasa) a una emulsión que contiene 10 mM de ácido oleico en Tris-HCl 20 mM (pH 8), NaCl 50 mM y $CaCl_2$ 1 mM (2 ml de volumen final).

Como un control negativo, la misma reacción se llevó a cabo usando el sobrenadante de TOP10 de *E. coli* sometido a ultrasonido que no expresa la oleato hidratasa (5,6 mg/ml de contenido de proteína total, sin oleato hidratasa). La mezcla de reacción se incubó bajo agitación durante la noche a temperatura ambiente. La reacción se detuvo al agregar 50 µl de HCL 3M (pH final de 1-2).

En este punto, se agregaron 4 ml de MTBE a la mezcla de reacción con el fin de extraer el sustrato orgánico (OA) y el producto (10-HSA). Los productos de reacción se derivatizaron mediante el agregado de 500 µl de trimetilsulfonio hidróxido (TMSH; 0,1 M en metanol) en 100 µl de solución de producto (30' a 100 ºC) y se analizaron mediante GC.

La Fig. 1 muestra la GC analítica de esta conversión enzimática.

Fig. 1 (A) Ácido oleico incubado durante la noche a RT con TOP10 de *E. coli* solamente. Tiempo de retención de ácido oleico: 8,161 min. (B) Ácido oleico incubado durante la noche a RT con TOP10 de *E. coli* que expresan oleato hidratasa. Tiempo de retención de 10-HSA: 9,340 min.

Según lo esperado, la oleato hidratasa expresada en células de TOP10 de *E. coli* fue capaz de convertir ácido oleico en 10-HSA casi por completo (>95 %). Las células de TOP10 de *E. coli* sometidas a ultrasonido sin oleato hidratasa no convirtieron ácido oleico.

Ejemplo 3

Conversión de ácido linoleico en ácido 10-hidroxi-12-octadecenoico (10-HOA)

La oleato hidratasa se expresó en TOP10 de *E. Coli* (10 L de cultivo) de acuerdo con el ejemplo 1. La lisis celular se realizó mediante resuspensión de comprimidos de células en 100 ml de Tris-HCl 20 mM (pH 8), NaCl 50 mM, $CaCl_2$ 1 mM, seguida de tratamiento con ultrasonido, según se describe anteriormente. La concentración de proteína total fue de 26 mg/ml (13 % de oleato hidratasa).

El sobrenadante (300-400 mg de oleato hidratasa) se agregó a una solución que contenía 900 ml de Tris-HCl 20 mM (pH 8), NaCl 50 mM, $CaCl_2$ 1 mM y 14,4 g de ácido linoleico (≈ 50 mM). La mezcla de reacción se agitó a RT durante 72 h. Una vez que se completó la reacción, se ajustó el pH a 1,5 mediante el agregado de HCL 3M. El producto se extrajo luego con 1L de MTBE y se filtró en 100 g de Celite 535. Después de retirar el MTBE mediante destinación, el producto de reacción 10-HOA se obtuvo en alto rendimiento (13,6 g, rendimiento: 89 %). Se prepararon muestras para GC y GC-MS analíticas mediante el agregado de 400 µl de N-trimetilsililimidazol (TSIM) en 100 µl de solución de producto (30' a 100 ºC).

Fig. 2 (A) Análisis GC de 10-HOA: tiempo de retención de 10-HOA: 9,971 min. (B) Análisis GC-MS del producto de reacción, que muestra el patrón de fragmentación común para 10-HOA.

Ejemplo 4

Pirólisis de ácido 10-hidroxi-12-octadecenoico (10-HOA) en un microrreactor

Se usó un microrreactor para las reacciones de pirólisis. La configuración experimental esquemática se muestra en la Fig. 3. La alimentación se dosificó en el reactor usando una bomba Bischoff para HPLC. El reactor es un tubo de acero con un diámetro interno de 1/16'' inmerso en un bloque de cobre sólido que puede calentarse hasta 800 ºC. Después de pasar un refrigerador (bloque de aluminio a temperatura ambiente), la mezcla de producto se recolecta en un matraz. Con esta configuración, los tiempos de residencia de < 1 segundo son posibles. Además, la mezcla completa se calienta a la temperatura conveniente muy rápido.

La Fig. 3 muestra la configuración experimental esquemática para corte térmico de ácido 10-hidroxi-12-octadecenoico (10-HOA) en un microrreactor.

a. Pirólisis de éster metílico del 10-HOA (Me-10-HOA)

En los primeros experimentos con microrreactor, el éster metílico del ácido 10-hidroxi-12-octadecenoico se eligió como reactivo con el fin de tener un manejo más sencillo (a saber, mejores propiedades de vaporización). MTBE y THF se comprobaron como solventes. En el caso de MTBE, se observó una gran cantidad de ácido 10-oxo-decanoico dimetilado (formación acetal c/metanol), lo que condujo a la conclusión de que el solvente se cortó

durante la reacción. Por lo tanto, se eligió el THF para experimentos adicionales (no se observaron productos cortados). Se evaluaron diferentes temperaturas y tiempos de residencia, así como también, el efecto de adición de agua (cantidad casi equimolar de agua se disolvió en la solución de reactivo). Los resultados se resumen en la Tabla 2.

Según se observa en la Tabla 2, la temperatura tiene el mayor efecto en la conversión del éster metílico del ácido 10-hidroxi-12-octadecenoico, mientras que la variación del tiempo de residencia tiene solo una pequeña influencia (una mayor variación de tiempo de residencia no resulta viable debido a la configuración del reactor pero probablemente hubiera tenido un impacto mayor en la conversión y selectividad). A 500 ºC, solo alrededor del 25 % del éster metílico del ácido 10-hidroxi-12-octadecenoico se convirtió (entrada 1 y 2), a 550 ºC ya se encuentra alrededor del 40 % (entradas 3-6) y a 600 ºC se puede obtener conversión total (entrada 7 y 8). La adición de agua parece tener un efecto beneficioso en la selectividad. Los mejores resultados se obtienen a 600 ºC y un tiempo de residencia de t = 1,3 seg con conversión completa del éster metílico del ácido 10-hidroxi-12-octadecenoico, alrededor del 75 % de selectividad hacia el producto retro-eno y solamente el 6,5 % de selectividad hacia los productos de deshidratación (éster metílico del ácido linoleico e isómeros, entrada 8).

Tabla 2: Resultados de pirólisis de éster metílico del ácido 10-hidroxi-12-octadecenoico en microrreactor (analizado por GC de muestra sililada).

No.	temp. [°C]	tiempo de residencia [seg]	agua	conv. [%]	sel. 10-ODA [%]	sel. deshidratación [%]
1	500	2,2	no	25,6	18,7	10,3
2	500	2,1	si	21,4	17,6	8,1
3	550	2,0	no	37,6	26,8	10,5
4	550	1,5	no	39,9	26,8	9,6
5	550	1,9	si	39,2	29,8	11,6
6	550	1,3	si	41,0	29,1	11,0
7	600	2,0	no	94,2	51,7	10,5
8	600	1,3	si	99,5	74,2	6,5

b. Pirólisis de ácido 10-hidroxioctadec-12-enoico (ácido 10-hidroxi-12-octadecenoico)

Ya que el uso del éster metílico del ácido 10-hidroxi-12-octadecenoico como reactivo significaría una etapa más en el esquema general de ácido linoleico a ácido sebácico, la configuración de microrreactor exitosa se comprobó también usando el ácido libre de ácido 10-hidroxi-12-octadecenoico (como solución de 10 % en peso en THF). En comparación con la pirólisis del éster metílico del ácido 10-hidroxi-12-octadecenoico, la conversión total del ácido 10-hidroxi-12-octadecenoico ya se obtuvo a temperaturas más bajas (575 ºC, entrada 5 en Tabla 3). Como en el caso del éster metílico del 10-hidroxi-12-octadecenoico, el tiempo de residencia no influye en la reacción en gran medida. Sin embargo, la selectividad hacia el ácido 10-oxo-decanoico resulta significativamente más baja (48 vs 74 %, compárese entrada 8 en Tabla 2). Se observó mayor deshidratación como reacción lateral, que podría deberse al comportamiento pobre en cuanto a vaporización del ácido graso libre en comparación con su éster metílico.

Tabla 3: Resultados de pirólisis de ácido 10-hidroxi-12-octadecenoico en microrreactor (analizado mediante GC de muestra sililada).

No.	temp. [°C]	tiempo de residencia [seg]	conv. [%]	sel. 10-ODA [%]	sel. deshidratación [%]
1	500	2,0	27,2	17,0	8,5
2	525	1,9	42,3	21,3	18,7
3	550	1,9	72,2	32,3	35,1
4	550	1,4	73,0	33,2	32,8
5	575	1,9	99,8	48,3	38,1

Ejemplo 5

Oxidación de ácido 10-oxo-decanoico en ácido sebácico

La oxidación del ácido 10-oxo-decanoico en ácido sebácico puede llevarse a cabo según se describe por H.-J. Arpe (Industrial Organic Chemistry, Wiley-VCH, 2007, pp. 149): El aldehído se oxida con agentes de oxidación suaves, como, por ejemplo, aire u oxígeno puro en fase líquida hasta 100 ºC y hasta 7 bar, ya sea sin catalizar o con catalización de manera homogénea mediante metales activos redox, como, por ejemplo, Cu, Fe, Co, Mn.

Listado de secuencias

<110> BASF SE

<120> Proceso para preparación de ácido sebácico

<130> PF73172

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1941

<212> ADN

<213> Elizabethkingia meningoseptica

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1941)

<400> 1

```
atg aat ccg att acc agc aaa ttt gat aaa gtg ctg aat gcc agc agc        48
Met Asn Pro Ile Thr Ser Lys Phe Asp Lys Val Leu Asn Ala Ser Ser
1               5                  10                  15

gaa tat ggt cat gtt aat cat gaa ccg gat agc agc aaa gaa cag cag        96
Glu Tyr Gly His Val Asn His Glu Pro Asp Ser Ser Lys Glu Gln Gln
            20                  25                  30
```

```
cgt aat aca ccg cag aaa agc atg ccg ttt agc gat cag att ggt aat        144
Arg Asn Thr Pro Gln Lys Ser Met Pro Phe Ser Asp Gln Ile Gly Asn
        35                  40                  45

tat cag cgc aat aaa ggt att ccg gtg cag agc tat gat aat agc aaa        192
Tyr Gln Arg Asn Lys Gly Ile Pro Val Gln Ser Tyr Asp Asn Ser Lys
    50                  55                  60

att tat att att ggc agc ggc att gca ggt atg agc gca gca tat tat        240
Ile Tyr Ile Ile Gly Ser Gly Ile Ala Gly Met Ser Ala Ala Tyr Tyr
65                  70                  75                  80

ttt att cgt gat ggc cat gtt ccg gca aaa aat att acc ttt ctg gaa        288
Phe Ile Arg Asp Gly His Val Pro Ala Lys Asn Ile Thr Phe Leu Glu
                85                  90                  95

cag ctg cat att gat ggt ggt agc ctg gat ggt gca ggt aat ccg acc        336
Gln Leu His Ile Asp Gly Gly Ser Leu Asp Gly Ala Gly Asn Pro Thr
            100                 105                 110

gat ggt tat att att cgt ggt ggt cgt gaa atg gat atg acc tat gaa        384
Asp Gly Tyr Ile Ile Arg Gly Gly Arg Glu Met Asp Met Thr Tyr Glu
        115                 120                 125

aat ctg tgg gac atg ttt cag gat att ccg gca ctg gaa atg cct gca        432
Asn Leu Trp Asp Met Phe Gln Asp Ile Pro Ala Leu Glu Met Pro Ala
    130                 135                 140

ccg tat agc gtt ctg gat gaa tat cgt ctg att aat gat aat gat agc        480
Pro Tyr Ser Val Leu Asp Glu Tyr Arg Leu Ile Asn Asp Asn Asp Ser
145                 150                 155                 160

  aat tat agc aaa gca cgc ctg att aat aac aaa ggc gaa att aaa gat       528
  Asn Tyr Ser Lys Ala Arg Leu Ile Asn Asn Lys Gly Glu Ile Lys Asp
                  165                 170                 175

  ttt agc aaa ttt ggc ctg aat aaa atg gat cag ctg gca att att cgc       576
  Phe Ser Lys Phe Gly Leu Asn Lys Met Asp Gln Leu Ala Ile Ile Arg
              180                 185                 190

  ctg ctg ctg aaa aat aaa gaa gaa ctg gac gat ctg acc att gaa gat       624
  Leu Leu Leu Lys Asn Lys Glu Glu Leu Asp Asp Leu Thr Ile Glu Asp
          195                 200                 205

  tat ttt agc gaa agt ttt ctg aaa agc aat ttt tgg acc ttt tgg cgt       672
  Tyr Phe Ser Glu Ser Phe Leu Lys Ser Asn Phe Trp Thr Phe Trp Arg
      210                 215                 220

  acc atg ttt gcc ttt gaa aat tgg cat agc ctg ctg gaa ctg aaa ctg       720
  Thr Met Phe Ala Phe Glu Asn Trp His Ser Leu Leu Glu Leu Lys Leu
  225                 230                 235                 240

  tat atg cat cgt ttt ctg cat gcc att gat ggt ctg aat gat ctg agc       768
  Tyr Met His Arg Phe Leu His Ala Ile Asp Gly Leu Asn Asp Leu Ser
                  245                 250                 255

  agc ctg gtt ttt ccg aaa tac aat cag tat gat acc ttt gtt aca ccg       816
  Ser Leu Val Phe Pro Lys Tyr Asn Gln Tyr Asp Thr Phe Val Thr Pro
              260                 265                 270
```

```
ctg cgt aaa ttt ctg cag gaa aaa ggc gtt aat att cat ctg aat acc        864
Leu Arg Lys Phe Leu Gln Glu Lys Gly Val Asn Ile His Leu Asn Thr
        275                 280                 285

ctg gtg aaa gat ctg gat att cat att aat acc gaa ggc aaa gtg gtg        912
Leu Val Lys Asp Leu Asp Ile His Ile Asn Thr Glu Gly Lys Val Val
    290                 295                 300

gaa ggc att att acc gaa cag gat ggt aaa gaa gtg aaa att ccg gtt        960
Glu Gly Ile Ile Thr Glu Gln Asp Gly Lys Glu Val Lys Ile Pro Val
305                 310                 315                 320

ggc aaa aat gat tat gtg att gtt acc acc ggc agc atg acc gaa gat       1008
Gly Lys Asn Asp Tyr Val Ile Val Thr Thr Gly Ser Met Thr Glu Asp
                325                 330                 335

acc ttt tat ggc aat aat aaa acc gca ccg att att ggc att gat aat       1056
Thr Phe Tyr Gly Asn Asn Lys Thr Ala Pro Ile Ile Gly Ile Asp Asn
            340                 345                 350

agc acc agc ggt cag agc gca ggt tgg aaa ctg tgg aaa aat ctg gca       1104
Ser Thr Ser Gly Gln Ser Ala Gly Trp Lys Leu Trp Lys Asn Leu Ala
        355                 360                 365

gca aaa agc gaa att ttt ggc aaa ccg gaa aaa ttt tgc agc aat att       1152
Ala Lys Ser Glu Ile Phe Gly Lys Pro Glu Lys Phe Cys Ser Asn Ile
    370                 375                 380

gaa aaa agc gca tgg gaa agc gca acc ctg acc tgt aaa ccg agc gca       1200
Glu Lys Ser Ala Trp Glu Ser Ala Thr Leu Thr Cys Lys Pro Ser Ala
385                 390                 395                 400

ctg att gat aaa ctg aaa gaa tat agc gtg aat gat ccg tat agc ggt       1248
Leu Ile Asp Lys Leu Lys Glu Tyr Ser Val Asn Asp Pro Tyr Ser Gly
                405                 410                 415

aaa acc gtt acc ggt ggt att att acc att acc gat agc aat tgg ctg       1296
Lys Thr Val Thr Gly Gly Ile Ile Thr Ile Thr Asp Ser Asn Trp Leu
            420                 425                 430

atg agc ttt acc tgt aat cgt cag ccg cat ttt ccg gaa cag ccg gat       1344
Met Ser Phe Thr Cys Asn Arg Gln Pro His Phe Pro Glu Gln Pro Asp
        435                 440                 445

gat gtt ctg gtt ctg tgg gtt tat gca ctg ttt atg gat aaa gaa ggc       1392
Asp Val Leu Val Leu Trp Val Tyr Ala Leu Phe Met Asp Lys Glu Gly
    450                 455                 460

aat tat att aaa aaa acc atg ctg gaa tgc acc ggt gat gaa att ctg       1440
Asn Tyr Ile Lys Lys Thr Met Leu Glu Cys Thr Gly Asp Glu Ile Leu
465                 470                 475                 480

gca gaa ctg tgt tat cat ctg ggt att gaa gat cag ctg gaa aat gtg       1488
Ala Glu Leu Cys Tyr His Leu Gly Ile Glu Asp Gln Leu Glu Asn Val
                485                 490                 495

cag aaa aat acc att gtt cgc acc gca ttt atg ccg tat att acc agc       1536
Gln Lys Asn Thr Ile Val Arg Thr Ala Phe Met Pro Tyr Ile Thr Ser
            500                 505                 510
```

```
atg ttt atg cct cgt gca aaa ggt gat cgt ccg cgt gtt gtt ccg gaa       1584
Met Phe Met Pro Arg Ala Lys Gly Asp Arg Pro Arg Val Val Pro Glu
        515                 520                 525

ggt tgt aaa aat ctg ggt ctg gtt ggt cag ttt gtg gaa acc aat aat       1632
Gly Cys Lys Asn Leu Gly Leu Val Gly Gln Phe Val Glu Thr Asn Asn
    530                 535                 540

gat gtg gtg ttt acc atg gaa agc agc gtt cgt acc gca cgt att gcc       1680
Asp Val Val Phe Thr Met Glu Ser Ser Val Arg Thr Ala Arg Ile Ala
545                 550                 555                 560

gtt tat aaa ctg ctg aat ctg aat aaa cag gtg ccg gat att aat ccg       1728
Val Tyr Lys Leu Leu Asn Leu Asn Lys Gln Val Pro Asp Ile Asn Pro
                565                 570                 575

ctg cag tat gat att cgt cat ctg ctg aaa gca gcc aaa acc ctg aat       1776
Leu Gln Tyr Asp Ile Arg His Leu Leu Lys Ala Ala Lys Thr Leu Asn
            580                 585                 590

gat gat aaa ccg ttt gtt ggt gaa ggt ctg ctg cgc aaa gtt ctg aaa       1824
Asp Asp Lys Pro Phe Val Gly Glu Gly Leu Leu Arg Lys Val Leu Lys
        595                 600                 605

ggc acc tat ttt gaa cat gtt ctg cca gca ggc gca gcc gaa gaa gaa       1872
Gly Thr Tyr Phe Glu His Val Leu Pro Ala Gly Ala Ala Glu Glu Glu
    610                 615                 620

gaa cac gaa agt ttt att gcc gaa cat gtg aat aaa ttt cgc gaa tgg       1920
Glu His Glu Ser Phe Ile Ala Glu His Val Asn Lys Phe Arg Glu Trp
625                 630                 635                 640

gtg aaa ggt att cgc ggt taa                                          1941
Val Lys Gly Ile Arg Gly
                645
```

<210> 2

<211> 646

<212> PRT

<213> Elizabethkingia meningoseptica

<400> 2

```
Met Asn Pro Ile Thr Ser Lys Phe Asp Lys Val Leu Asn Ala Ser Ser
1               5                   10                  15

Glu Tyr Gly His Val Asn His Glu Pro Asp Ser Ser Lys Glu Gln Gln
            20                  25                  30

Arg Asn Thr Pro Gln Lys Ser Met Pro Phe Ser Asp Gln Ile Gly Asn
        35                  40                  45
```

Tyr Gln Arg Asn Lys Gly Ile Pro Val Gln Ser Tyr Asp Asn Ser Lys
50 55 60

Ile Tyr Ile Ile Gly Ser Gly Ile Ala Gly Met Ser Ala Ala Tyr Tyr
65 70 75 80

Phe Ile Arg Asp Gly His Val Pro Ala Lys Asn Ile Thr Phe Leu Glu
85 90 95

Gln Leu His Ile Asp Gly Gly Ser Leu Asp Gly Ala Gly Asn Pro Thr
100 105 110

Asp Gly Tyr Ile Ile Arg Gly Gly Arg Glu Met Asp Met Thr Tyr Glu
115 120 125

Asn Leu Trp Asp Met Phe Gln Asp Ile Pro Ala Leu Glu Met Pro Ala
130 135 140

Pro Tyr Ser Val Leu Asp Glu Tyr Arg Leu Ile Asn Asp Asn Asp Ser
145 150 155 160

Asn Tyr Ser Lys Ala Arg Leu Ile Asn Asn Lys Gly Glu Ile Lys Asp
165 170 175

Phe Ser Lys Phe Gly Leu Asn Lys Met Asp Gln Leu Ala Ile Ile Arg
180 185 190

Leu Leu Leu Lys Asn Lys Glu Glu Leu Asp Asp Leu Thr Ile Glu Asp
195 200 205

Tyr Phe Ser Glu Ser Phe Leu Lys Ser Asn Phe Trp Thr Phe Trp Arg
210 215 220

Thr Met Phe Ala Phe Glu Asn Trp His Ser Leu Leu Glu Leu Lys Leu
225 230 235 240

```
Tyr Met His Arg Phe Leu His Ala Ile Asp Gly Leu Asn Asp Leu Ser
                245                 250                 255

Ser Leu Val Phe Pro Lys Tyr Asn Gln Tyr Asp Thr Phe Val Thr Pro
            260                 265                 270

Leu Arg Lys Phe Leu Gln Glu Lys Gly Val Asn Ile His Leu Asn Thr
        275                 280                 285

Leu Val Lys Asp Leu Asp Ile His Ile Asn Thr Glu Gly Lys Val Val
    290                 295                 300

Glu Gly Ile Ile Thr Glu Gln Asp Gly Lys Glu Val Lys Ile Pro Val
305                 310                 315                 320

Gly Lys Asn Asp Tyr Val Ile Val Thr Thr Gly Ser Met Thr Glu Asp
                325                 330                 335

Thr Phe Tyr Gly Asn Asn Lys Thr Ala Pro Ile Ile Gly Ile Asp Asn
            340                 345                 350

Ser Thr Ser Gly Gln Ser Ala Gly Trp Lys Leu Trp Lys Asn Leu Ala
        355                 360                 365

Ala Lys Ser Glu Ile Phe Gly Lys Pro Glu Lys Phe Cys Ser Asn Ile
    370                 375                 380

Glu Lys Ser Ala Trp Glu Ser Ala Thr Leu Thr Cys Lys Pro Ser Ala
385                 390                 395                 400

Leu Ile Asp Lys Leu Lys Glu Tyr Ser Val Asn Asp Pro Tyr Ser Gly
                405                 410                 415

Lys Thr Val Thr Gly Gly Ile Ile Thr Ile Thr Asp Ser Asn Trp Leu
            420                 425                 430

Met Ser Phe Thr Cys Asn Arg Gln Pro His Phe Pro Glu Gln Pro Asp
        435                 440                 445

Asp Val Leu Val Leu Trp Val Tyr Ala Leu Phe Met Asp Lys Glu Gly
    450                 455                 460

Asn Tyr Ile Lys Lys Thr Met Leu Glu Cys Thr Gly Asp Glu Ile Leu
465                 470                 475                 480
```

```
Ala Glu Leu Cys Tyr His Leu Gly Ile Glu Asp Gln Leu Glu Asn Val
                485                 490                 495

Gln Lys Asn Thr Ile Val Arg Thr Ala Phe Met Pro Tyr Ile Thr Ser
            500                 505                 510

Met Phe Met Pro Arg Ala Lys Gly Asp Arg Pro Arg Val Val Pro Glu
        515                 520                 525

Gly Cys Lys Asn Leu Gly Leu Val Gly Gln Phe Val Glu Thr Asn Asn
    530                 535                 540

Asp Val Val Phe Thr Met Glu Ser Ser Val Arg Thr Ala Arg Ile Ala
545                 550                 555                 560

Val Tyr Lys Leu Leu Asn Leu Asn Lys Gln Val Pro Asp Ile Asn Pro
                565                 570                 575

Leu Gln Tyr Asp Ile Arg His Leu Leu Lys Ala Ala Lys Thr Leu Asn
            580                 585                 590

Asp Asp Lys Pro Phe Val Gly Glu Gly Leu Leu Arg Lys Val Leu Lys
        595                 600                 605

Gly Thr Tyr Phe Glu His Val Leu Pro Ala Gly Ala Ala Glu Glu Glu
    610                 615                 620

Glu His Glu Ser Phe Ile Ala Glu His Val Asn Lys Phe Arg Glu Trp
625                 630                 635                 640

Val Lys Gly Ile Arg Gly
                645
```

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de preparación de ácido sebácico haciendo reaccionar
en una primera etapa (i) ácido linoleico con agua, catalizado por una oleato hidratasa para formar ácido 10-hidroxi-12-octadecenoico,
en una segunda etapa (ii) pirolizar el ácido 10-hidroxi-12-octadecenoico en 1-octeno y ácido 10-oxo-decanoico y
en una tercera etapa (iii) oxidar el ácido 10-oxo-decanoico en ácido sebácico.

2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la oleato hidratasa es un polipéptido que tiene SEQ ID NO:2.

3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que después de la etapa (i), el ácido 10-hidroxi-12-octadecenoico se esterifica para formar un éster del ácido 10-hidroxi-12-octadecenoico y, posteriormente, el éster del ácido 10-hidroxi-12-octadecenoico se piroliza en la etapa (ii).

4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el éster de ácido 10-hidroxi-12-octadecenoico es un éster metílico.

5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la pirólisis en la etapa (ii) se lleva a cabo a una temperatura de entre 400 y 800 ºC, más preferiblemente, de entre 500 y 600 ºC.

6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la pirólisis se lleva a cabo en un aparato microestructurado.

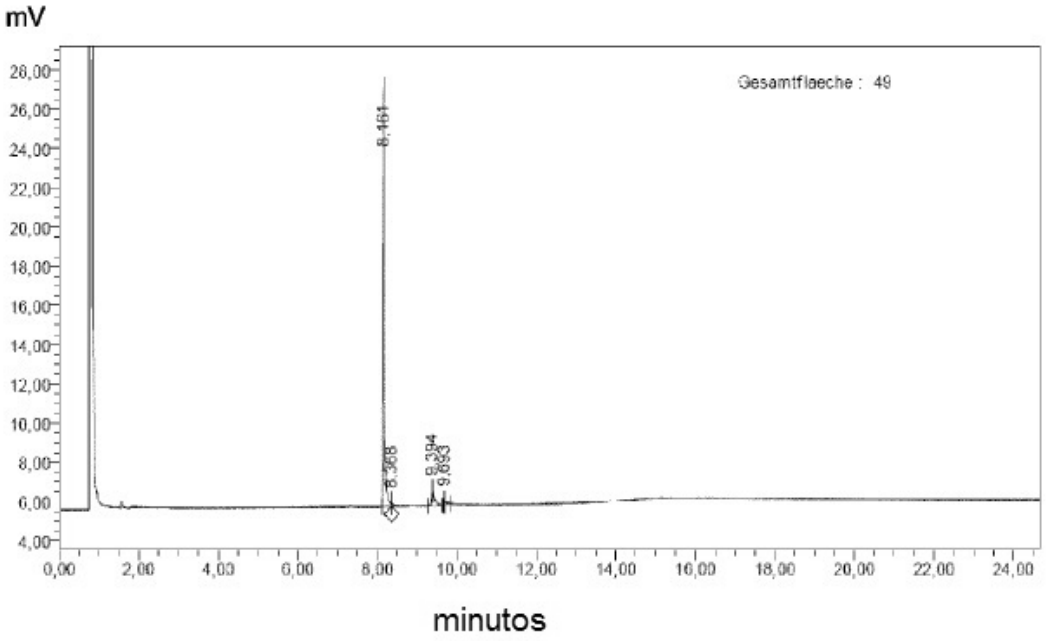
7. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la pirólisis en la etapa (ii) se lleva a cabo en THF como un solvente.

8. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la oxidación en la etapa (iii) se lleva a cabo mediante aire.

9. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la etapa (iii) de oxidación se cataliza mediante un metal activo redox.

Fig.1

A


mV
Gesamtflaeche : 49
8,161
8,388
9,394
9,693
minutos

B

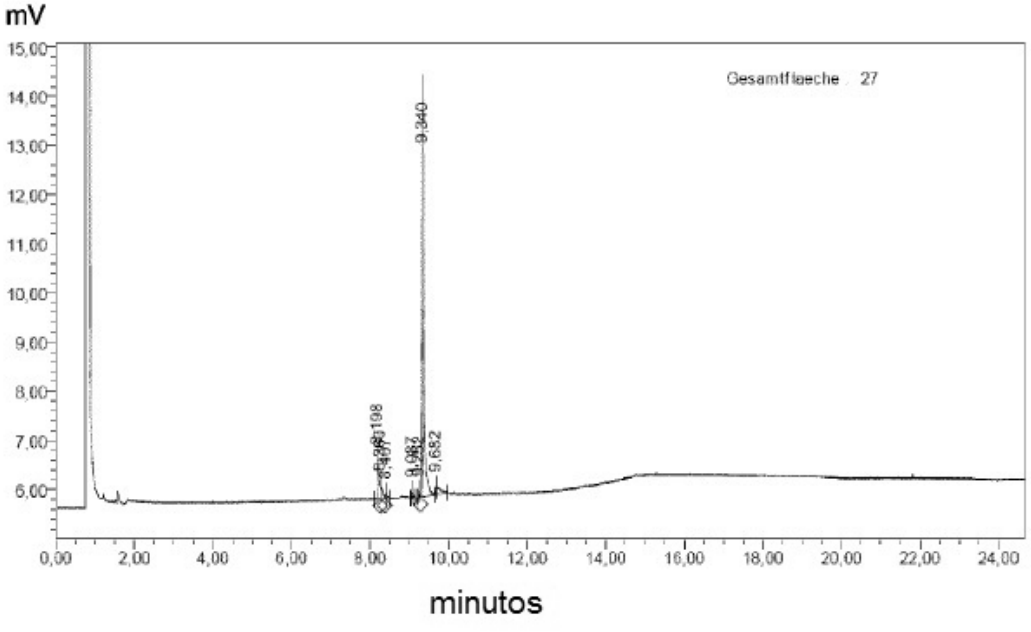
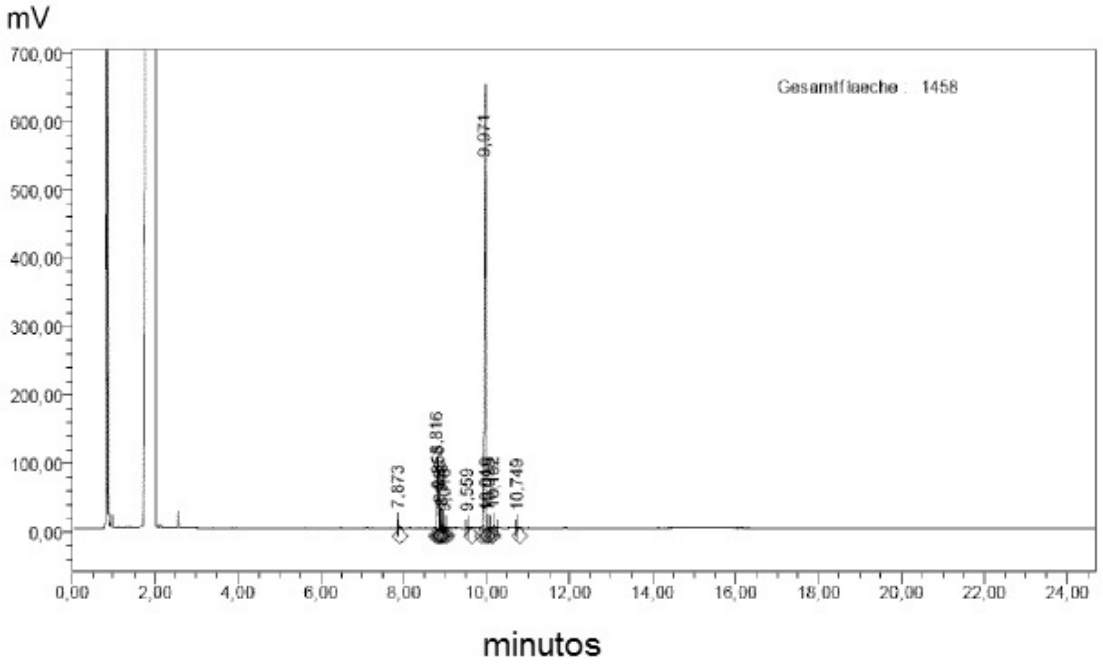
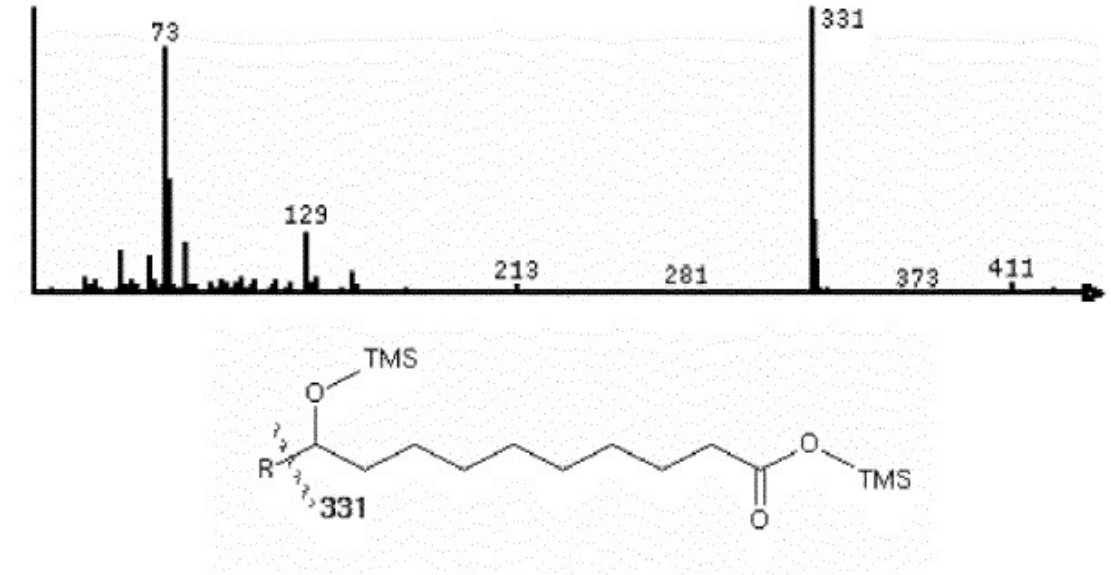

mV
Gesamtflaeche : 27
9,340
9,682
minutos

Fig. 2

A

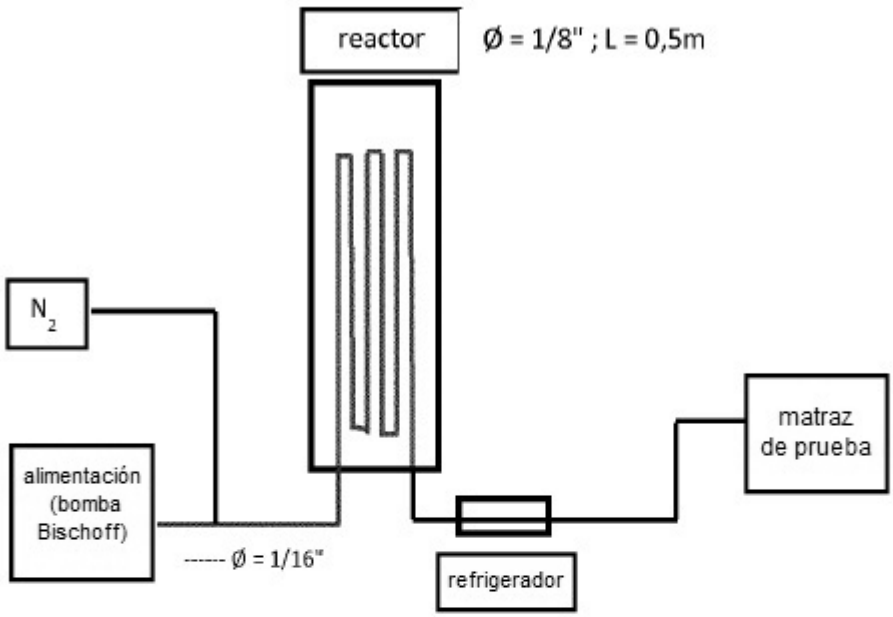

mV
Gesamtfläche : 1458
9,071
7,873
9,559
10,749
minutos

B


73
331
129
213
281
373
411

TMS
O
R
331
O
O
TMS

Fig. 3


reactor
Ø = 1/8" ; L = 0,5m
N2
alimentación (bomba Bischoff)
------ Ø = 1/16"
refrigerador
matraz de prueba