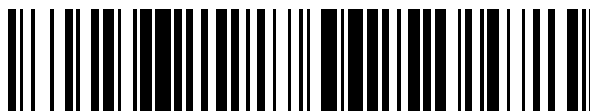


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 710 934**

51 Int. Cl.:

B01J 39/04	(2007.01)	C02F 101/38	(2006.01)
B01J 39/16	(2007.01)		
B01D 11/04	(2006.01)		
C07C 227/40	(2006.01)		
C07C 209/84	(2006.01)		
C07C 209/90	(2006.01)		
C02F 1/42	(2006.01)		
C02F 1/26	(2006.01)		
C02F 103/36	(2006.01)		
C02F 101/30	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.07.2013 PCT/EP2013/065563**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **27.02.2014 WO14029577**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.07.2013 E 13739729 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.11.2018 EP 2888046**

54 Título: **Ácidos grasos ramificados como intercambiadores de cationes líquidos**

30 Prioridad:

21.08.2012 EP 12181153

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

29.04.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**ERHARDT, FRANK;
FALKE, LUKAS;
KELLE, RALF;
HÄGER, HARALD;
HAAS, THOMAS;
HENNEMANN, HANS-GEORG;
THUM, OLIVER;
ROOS, MARTIN y
PÖTTER, MARKUS**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 710 934 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

Ácidos grasos ramificados como intercambiadores de cationes líquidos

La presente invención se refiere a un procedimiento para separar un compuesto orgánico de una solución acuosa, así como a una mezcla de reacción que comprende una solución acuosa que contiene un compuesto orgánico.

- 5 Un problema fundamental en la preparación biotecnológica de productos químicos puros partiendo de materias primas renovables, los cuales, por lo demás se sintetizan partiendo de combustibles fósiles, estriba en transformar el producto obtenido, que se presenta típicamente en una fase acuosa de gran volumen, en una fase orgánica. Por un lado, esta transformación se realiza con el fin de concentrar un producto intermedio o final acabado y para posibilitar eventualmente el tratamiento sintético en etapas posteriores de la reacción en solución orgánica, por otra parte, con el fin de mejorar el rendimiento de la reacción en la fase acuosa mediante la separación del producto deseado o posibilitar, en general, solo el transcurso de la reacción en un marco técnicamente conveniente. La concentración térmica directa del producto que se presenta a menudo en bajas concentraciones a partir de la fase acuosa de gran volumen no es conveniente por norma general.

- 15 La distribución de un compuesto en un sistema bifásico en equilibrio que comprende una fase hidrofílica acuosa y una fase hidrofóbica orgánica, que no se mezclan, depende de manera determinante de las propiedades físico-químicas del compuesto respectivo. Mientras que compuestos con una elevada proporción o que consisten exclusivamente en hidrocarburos no sustituidos se acumulan predominantemente en la fase hidrofóbica, compuestos con una elevada proporción de grupos polares, tales como funcionalidades con contenido en heteroátomos y de manera muy particular compuestos con cargas, se presentan de manera predominante o prácticamente de forma exclusiva en la fase acuosa, lo cual dificulta una transformación en una fase orgánica.

La distribución de un compuesto en el sistema bifásico mencionado después del ajuste del equilibrio se describe a menudo con ayuda de coeficientes de distribución, por ejemplo según la ecuación de Nernst

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

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

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

- 30 Ejemplos de compuestos orgánicos industrialmente fuertemente demandados, cargados positivamente en solución acuosa a pH fisiológico, lo representan el ácido 12-aminoláurico (ALS) y sus derivados, en particular el éster metílico (ALSME). ALS es un producto de partida importante en la preparación de polímeros. Habitualmente, ALS se prepara partiendo de materias primas fósiles en un proceso con un bajo rendimiento a través de laurina-lactama, la cual se sintetiza mediante trimerización de butadieno, subsiguiente hidrogenación bajo formación de ciclohexano, subsiguiente oxidación en ciclohexanona, reacción con hidroxilaurina y subsiguiente reacción de transposición de Beckmann. Una vía muy prometedora para la preparación biotecnológica de ALS o bien ALSME se describe en el documento DE 10200710060705.

- 35 El estado de la técnica enseña la obtención de compuestos orgánicos positivamente cargados mediante la puesta en contacto de una mezcla de reacción acuosa que comprende una célula metabólicamente activa con una fase orgánica que comprende un disolvente orgánico. Así, por ejemplo, el documento DE 10200710060705 describe la obtención del producto ALSME mediante extracción con agitación con éster etílico del ácido acético a partir de una mezcla de reacción acuosa. Asano *et al.* (2008) dan a conocer la extracción de ALS con tolueno a partir de una solución acuosa de reacción que comprende una enzima sintetizadora de ALS, (Asano, Y., Fukuda, Y., Yoshida, Y., y Komeda, H. (2008): The Screening, Characterisation, and Use of ω -Laurilactam Hydrolase: A New Enzymatic Synthesis of 12-Aminolauric Acid, *Biosc. Biotechn. Biochem.*, **72** (8), 2141-2150).

- 40 El documento US 4 855 053 describe un procedimiento para la extracción de compuestos orgánicos tales como aminoácidos, aminas, lactamas y fenoles a partir de soluciones acuosas bajo el empleo de ácidos carboxílicos ramificados y no ramificados.

La presente invención tiene por misión, por lo tanto, proporcionar un procedimiento para la separación de orgánicos positivamente cargados de acuerdo con la reivindicación 1 y una mezcla de reacción correspondiente de acuerdo con la reivindicación 11.

Este y otros problemas se resuelven mediante el objeto de las reivindicaciones independientes adjuntas, resultando formas de realización a partir de las reivindicaciones subordinadas.

En un primer aspecto, el problema en el que se fundamenta la invención se resuelve mediante un procedimiento para la separación de un compuesto orgánico de una solución acuosa de acuerdo con la reivindicación 1.

- 5 En una segunda forma de realización del primer aspecto, la cual se trata también de una forma de realización de la primera forma de realización, el problema se resuelve mediante un procedimiento en el que la proporción de ingredientes de intercambiador de cationes líquido a compuesto orgánico asciende en la etapa b) a al menos 1.

- 10 En una tercera forma de realización del primer aspecto, la cual se trata también de una forma de realización de la primera a la segunda forma de realización, el problema se resuelve mediante un procedimiento, en donde la relación en volumen de solución orgánica a solución acuosa asciende a 1:10 hasta 10:1.

En una cuarta forma de realización del primer aspecto, la cual se trata también de una forma de realización de la primera a tercera formas de realización, el problema se resuelve mediante un procedimiento en el que el intercambiador de cationes líquido es un ácido graso ramificado de la fórmula $(H_3C)_2-CH-(CH_2)_n-COOH$ o de una forma no protonada de la misma y n es al menos 4, preferiblemente al menos 8 y lo más preferiblemente es 14.

- 15 En una quinta forma de realización del primer aspecto, la cual se trata también de una forma de realización de la primera a cuarta formas de realización, el problema se resuelve mediante un procedimiento en el que la solución acuosa comprende, además, una célula metabólicamente activa.

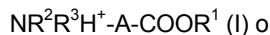
- 20 En una sexta forma de realización del primer aspecto, la cual se trata también de una forma de realización de la primera a quinta formas de realización, el problema se resuelve mediante un procedimiento, en el que la solución orgánica contiene, además de ello, al menos un disolvente orgánico, preferiblemente un ácido graso y/o un éster de ácido graso.

- 25 En una séptima forma de realización del primer aspecto, la cual se trata también de una forma de realización de la primera a sexta forma de realización, el problema se resuelve mediante un procedimiento, en el que la solución orgánica hidrofóbica contiene al intercambiador de cationes hidrofóbico líquido en una proporción en volumen de 20 a 80 %, preferiblemente de 25 a 75 %.

- 30 En una octava forma de realización del primer aspecto, la cual se trata también de una forma de realización de la primera a séptima formas de realización del primer aspecto, el compuesto orgánico es una diamina elegida del grupo que comprende butandiamina, 1,5-pentandiamina, 1,6-hexandiamina, 1,8-octandiamina, 1,14-tetradecandiamina, 1,18-octadecandiamina, 2-metil-1,5-diaminopentano, 2,2-dimetil-1,5-diaminopentano, 4,4'-diaminod ciclohexilmetano, 3,3'-dimetil-4,4'-diaminod ciclohexilmetano, 3,3',5,5'-tetrametil-4,4'-diaminod ciclohexilmetano, 2,2,4- o 2,4,4-trimetilhexametildiamina, 1,4-diaminod ciclohexano, 4,4'-diaminod ciclohexilpropano e isoforondiamina.

En una novena forma de realización del primer aspecto, la cual se trata también de una forma de realización de la primera a octava formas de realización, la temperatura en la etapa b) oscila entre 28 y 70 °C, preferiblemente entre 30 y 37 °C.

- 35 En un segundo aspecto, el problema en el que se fundamenta la invención se resuelve mediante una mezcla de reacción conforme a la reivindicación 11.



- 40 En una primera forma de realización del segundo aspecto, el problema se resuelve mediante una mezcla de reacción, en donde el intercambiador de cationes hidrofóbico líquido es un ácido graso ramificado de la fórmula $(H_3C)_2-CH-(CH_2)_n-COOH$ o una forma no protonada del mismo y n es al menos 4, preferiblemente asciende al menos a 8 y lo más preferiblemente es 14.

En una segunda forma de realización del segundo aspecto, la cual se trata también de una forma de realización de la primera forma de realización del segundo aspecto, la solución acuosa comprende, además, una célula metabólicamente activa.

- 45 En una tercera forma de realización del segundo aspecto, la cual se trata también de una forma de realización de la primera a segunda formas de realización del segundo aspecto, el compuesto orgánico es una diamina elegida del grupo que comprende butandiamina, 1,5-pentandiamina, 1,6-hexandiamina, 1,8-octandiamina, 1,14-tetradecandiamina, 1,18-octadecandiamina, 2-metil-1,5-diaminopentano, 2,2-dimetil-1,5-diaminopentano, 4,4'-

diaminod ciclohexilmetano, 3,3'-dimetil-4,4'-diaminod ciclohexilmetano, 3,3',5,5'-tetrametil-4,4'-diaminod ciclohexilmetano, 2,2,4- o 2,4,4-trimetilhexametildiamina, 1,4-diaminociclohexano, 4,4'-diaminod ciclohexilpropano e isoforondiamina.

5 Los autores de la presente invención han encontrado que la eficiencia de la separación de un compuesto orgánico con una carga positiva a partir de una solución acuosa en una solución orgánica hidrofóbica se puede aumentar sorprendentemente cuando esta solución orgánica comprende un intercambiador de cationes líquido, el cual se trata de un ácido alcanoico saturado con al menos un sustituyente alquilo. Sin desear estar ligado a teoría alguna, los autores de la presente invención sospechan que la carga negativa o bien las cargas negativas del intercambiador de cationes líquido interactúa/interactúan iónicamente con la una carga positiva o las varias cargas positivas de los compuestos orgánicos, y que esta interacción conduce a un enmascaramiento de al menos una carga positiva la cual aumenta la solubilidad en la fase orgánica.

15 La presente invención prevé el uso de un ácido alcanoico saturado con al menos un sustituyente alquilo como intercambiador de cationes hidrofóbico líquido para la separación de un compuesto orgánico con una carga positiva a partir de una solución acuosa, preferiblemente bajo la acumulación del compuesto orgánico en la solución orgánica hidrofóbica. En una forma de realización preferida, por la expresión "ácido alcanoico saturado con al menos un sustituyente alquilo" se entiende un ácido alcanoico de la fórmula $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$ o una forma no protonada del mismo, en el que al menos un átomo de hidrógeno de la cadena de alquilo está intercambiado por un sustituyente alquilo de la fórmula $-(\text{CH}_2)_m-\text{H}$, en donde n y m pueden ser, en cada caso e independientemente uno de otro, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30. En una forma de realización más preferida, en el caso del ácido alcanoico saturado con al menos un sustituyente alquilo se trata de un compuesto del grupo que comprende ácido isoesteárico, ácido isopalmítico, ácido isomirístico, ácido fitánico, ácido 2-hexildecanoico, ácido 2-butiloctanoico, ácido 15-metilhexadecanoico, ácido 13-metiltetradecanoico. En una forma de realización particularmente preferida, el átomo de carbono penúltimo en la cadena de alquilo está sustituido, de manera particularmente preferida con un grupo metilo. De acuerdo con la invención se pueden utilizar expresamente mezclas de diferentes ácidos alcanoicos saturados con al menos un sustituyente alquilo, opcionalmente con otros intercambiadores de cationes hidrofóbicos líquidos, estructuralmente distintos de los últimos.

25 En una forma de realización preferida, el intercambiador de cationes líquido es un ácido graso ramificado que comprende exclusivamente otros sustituyentes que no sean cíclicos, es decir, la molécula es lineal, por lo tanto no comprende estructuras en forma de anillo.

30 Como muchos compuestos en esta solicitud, un ácido alcanoico saturado con al menos un sustituyente alquilo comprende, en una forma de realización preferida, igualmente formas no protonadas, parcial y totalmente protonadas del compuesto.

35 La enseñanza de acuerdo con la invención es adecuada para la separación de compuestos orgánicos estructuralmente diversos con una carga positiva y una carga total positiva o neutra a partir de una solución acuosa. De acuerdo con la invención, en el caso del compuesto orgánico se trata de un compuesto de la fórmula



40 en donde A es un grupo alquileo con al menos tres, preferiblemente al menos seis, de manera particularmente preferida ocho átomos de carbono, que preferiblemente no está sustituido y es de cadena lineal. En el caso de A se puede tratar de un alcano ramificado o no ramificado, lineal o cíclico, o de un compuesto aromático o un compuesto heteroaromático que está sustituido al menos con los dos sustituyentes indicados en la fórmula (II). En una forma de realización particularmente preferida, en el caso del compuesto orgánico se trata de un compuesto de la fórmula II, y A representa una cadena de alquileo de la fórmula $-(\text{CH}_2)_n-$, en donde n es 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40, y de manera particularmente preferida, adicionalmente $\text{R}^2 = \text{R}^3 = \text{R}^4 = \text{R}^5 = \text{H}$, y en donde R^2 , R^3 , R^4 y R^5 , en cada caso e independientemente uno de otro, se eligen del grupo que comprende hidrógeno, metilo, etilo y propilo. En una forma de realización preferida, se trata de ácido aminoláurico o de un éster del mismo, preferiblemente el éster metílico.

45 En una forma de realización preferida, la expresión "intercambiador de cationes líquido", tal como se utiliza en esta memoria, significa un compuesto soluble en un disolvente hidrofóbico orgánico líquido a temperatura ambiente, el cual, en virtud de una carga negativa presente al menos en parte en el grupo carboxilato del ácido alcanoico, está en condiciones de configurar, al menos de manera transitoria, una interacción iónica con al menos un catión.

En el caso de la solución acuosa, de la cual se separa el compuesto orgánico, se trata preferiblemente de una solución tampón con contenido en agua o de un medio de cultivo acuoso que contiene agua todavía más

preferiblemente como disolvente predominante. Por ejemplo, la proporción de disolvente del agua en la solución acuosa asciende a más de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 99 por ciento en volumen o 100 por ciento en volumen. El experto en la materia es conocedor de numerosos medios de cultivo de tampón acuosos que son adecuados para la conservación o el cultivo de células, en particular células biotecnológicamente importantes. A ellos pertenecen de igual manera medios completos, tales como medios LB, medios mínimos, tales como medios M9, medios mínimos con componentes complejos, tales como extracto de levadura o peptona, combinaciones a base de los antes mencionados, así como medios selectivos, por ejemplo aquellos que contienen una elevada concentración de sales y, por lo tanto, solo posibilitan el crecimiento de organismos halófilos o al menos halotolerantes. En una forma de realización preferida, por la expresión “medio de cultivo acuoso”, tal como se utiliza en esta memoria, se entiende un medio de reacción a base de agua que, con relación a todos los factores relevantes, en particular el valor del pH, el contenido en sales y la temperatura, está constituido de manera que conserva o fomenta la vitalidad de células contenidas en el mismo, preferiblemente microorganismos, y están presentes tanto medio de cultivo acuoso como fase orgánica hidrofóbica en forma líquida. Las exigencias de temperatura de diferentes células biotecnológicamente importantes pueden deducirse de libros de texto de microbiología y de biología molecular, p. ej., Fuchs/Schlegel (2007) Allgemeine Mikrobiologie, 2008, editorial Georg Thieme. En una forma de realización no de acuerdo con la invención, el valor del pH del medio de cultivo acuoso se encuentra en el momento de la puesta en contacto entre 4 a 9, preferiblemente entre 4,5 a 8,5, lo más preferiblemente entre 6,2 y 7,2. En una forma de realización preferida, el valor del pH del medio de cultivo acuoso se mantiene en la etapa b) en el intervalo de pH 4 a 9, preferiblemente entre 4,5 y 8,5, lo más preferiblemente entre 6,2 y 7,2 durante al menos 0,5 h, más preferiblemente al menos 2 h, todavía más preferiblemente al menos 6 h y lo más preferiblemente al menos 12 h. El experto en la materia conoce del estado de la técnica cómo se puede ajustar y regular el valor del pH de una solución acuosa, en particular también de una solución acuosa que comprende células metabólicamente activas y medios necesarios para su cultivo, mediante la adición de ácido o base, por ejemplo ácido sulfúrico o bien agua amoniacal. En otra forma de realización preferida, la temperatura oscila entre 0 y 45 °C, preferiblemente entre 15 y 40 °C, lo más preferiblemente entre 20 y 37 °C.

En una forma de realización preferida de la presente invención, por la expresión “puesta en contacto”, tal como se utiliza en esta memoria, se entiende que dos fases son expuestas enfrentadas una contra otra directamente y, en particular, sin intercalación de una barrera física tal como una membrana. La puesta en contacto tiene lugar en el caso más sencillo debido a que las dos fases son añadidas al mismo recipiente y son mezcladas entre sí de igual manera, por ejemplo mediante agitación. De manera muy expresa, para la realización de la enseñanza de acuerdo con la invención es posible, pero en ningún caso necesario, que esté presente un sistema bifásico. Más bien, es necesaria una buena mezcla a fondo, lo más continua posible de la suma de la solución acuosa y de la solución orgánica hidrofóbica, por ejemplo mediante agitación, de la separación de la solución orgánica de la solución acuosa.

En una forma de realización preferida, la expresión “presenta una carga”, tal como se utiliza en esta memoria, significa que un compuesto caracterizado de esta manera presenta una carga correspondiente de un grupo funcional adecuado en solución acuosa a pH 0 a 14, preferiblemente 2 a 12, 2 a 6, 8 a 12, 3 a 10, 6 a 8, lo más preferiblemente a pH 7, por ejemplo, una carga positiva de un grupo amonio. En una forma de realización preferida, se trata de una carga presente de forma permanente. En otra forma de realización preferida, la expresión “presenta una carga”, tal como se utiliza en esta memoria, significa que el grupo funcional o compuesto correspondiente está presente a pH 7 predominantemente con la carga correspondiente, es decir, en al menos un 50, preferiblemente un 90, todavía más preferiblemente un 99 %. Por ejemplo, la molécula etanolamina presenta a pH 0 una carga. En este caso, se trata del grupo amonio protonado. En una forma de realización preferida, la expresión “carga total” de un compuesto significa, por el contrario, la suma de todas las cargas del compuesto a pH 0 a 14, preferiblemente de 2 a 12, 2 a 6, 8 a 12, 3 a 10, 6 a 8, lo más preferiblemente a pH 7. Por ejemplo, el compuesto glicina presenta en solución acuosa a pH 6 dos cargas, a saber una carga negativa en la función carboxi y una carga positiva en el grupo amino protonado, es decir, en total una carga total neutra.

En una forma de realización preferida de la invención, la expresión “que contiene” se ha de entender en el sentido “que comprende”, es decir, no de forma excluyente. Una mezcla que contiene A puede presentar en este sentido, junto a A, otros componentes. La formulación “una o varias cargas” significa al menos una carga de la naturaleza correspondiente.

En una forma de realización preferida, por el término “hidrofóbico”, tal como se utiliza en esta memoria, se entiende la capacidad de un líquido de conformar una fase líquida propia, claramente delimitada de la fase acuosa, en presencia de una fase acuosa y en equilibrio, es decir, en particular en ausencia de medidas que se contrarresten, tales como agitación. En el caso de esta última, se puede tratar de una fase líquida coherente o de una emulsión. En otra forma de realización preferida, por el término “hidrofóbico”, tal como se utiliza en esta memoria, se entiende la propiedad de un compuesto de no disolverse esencialmente en agua. Finalmente, el término se entiende en otra forma de realización preferida, tal como se utiliza en esta memoria, de modo que un compuesto denominado de esta

manera presenta un valor P (J. Sangster, *Octanol-Water Partition Coefficients: Fundamentals and Physical Chemistry*, Vol. 2 de *Wiley Series in Solution Chemistry*, John Wiley & Sons, Chichester, 1997), cuyo logaritmo decimal es mayor que 0, preferiblemente mayor que 0,5, todavía más preferiblemente mayor que 1 y lo más preferiblemente mayor que 2. Disolventes orgánicos preferidos comprenden, pero no se limitan a 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 solución orgánica hidrofóbica puede ser también una mezcla que comprenda más de un disolvente orgánico hidrofóbico.

En otra forma de realización, el intercambiador de iones líquido no es tóxico o solo es moderadamente tóxico con relación a células metabólicamente activas, particularmente microorganismo biotecnológicamente relevantes. Por el término "tóxico", tal como se utiliza en esta memoria, se entiende en una forma de realización preferida la propiedad de un compuesto de reducir, al contacto con los microorganismos correspondientes, su velocidad de crecimiento, reducir su actividad metabólica, aumentar su consumo energético, reducir su densidad óptica o el número de células susceptibles de desarrollo, disminuir o inhibir su actividad metabólica biotecnológica o productividad y/o conducir directamente a su exterminio y lisis. En una forma de realización preferida, al menos uno de estos efectos en el caso de un compuesto tóxico se consigue ya en una concentración baja, preferiblemente en una concentración de 1000, más preferiblemente de 100, todavía más preferiblemente de 50 o 25, lo más preferiblemente de 5 mg/L. El experto en la materia conoce numerosos procedimientos aplicables de forma rutinaria, mediante los cuales se puede examinar la toxicidad. A ellos pertenecen, por ejemplo, la medición de la respiración de correspondientes microorganismos a través de electrodos de O₂ o de la analítica de gases de escape o el cultivo comparativo de muestras de microorganismos y el subsiguiente recuento de las unidades formadoras de colonias (ufcs). En una forma de realización preferida, por un "efecto tóxico moderado" se entiende que microorganismos que se encuentran en una fase de crecimiento continúan creciendo en presencia del compuesto y/o son metabólicamente activos, pero en menor medida que en el caso de un control que es incubado bajo las mismas condiciones en ausencia del correspondiente compuesto, y/o que presentan una fase lag prolongada.

La puesta en contacto de una solución acuosa y orgánica tiene lugar bajo condiciones adecuadas y, en particular, a lo largo de un espacio de tiempo que es suficiente para una conversión suficiente del compuesto orgánico de la fase acuosa a la fase orgánica, de manera ideal incluso para el ajuste del equilibrio correspondiente. Esta duración y las condiciones las puede determinar el experto en la materia en el marco de una experimentación rutinaria. En una forma de realización preferida, la etapa b) dura al menos 0,25, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 18, 24, 36 o 48 horas o más que una duración de este tipo. Datos adicionales para posibles modos de realizar la invención se describen en el documento EP 11154707.

La temperatura en la etapa b) depende no solo de las propiedades del intercambiador de cationes líquido, sino, en particular para el caso de que la puesta en contacto de la solución acuosa y de la solución orgánica tenga lugar en el caso de la reacción en curso en la fase acuosa, también de los requisitos de temperatura de posibles reacciones que tienen lugar en la fase acuosa. En particular, para el caso de que una célula metabólicamente activa sea catalíticamente activa en la fase acuosa, la temperatura para la conservación de esta actividad debe ser adecuada. En una forma de realización preferida, la temperatura en la etapa b) asciende a 0 hasta 100 °C, preferiblemente a 20 hasta 80 °C, 28 a 70 °C, 30 a 37°C, 35 a 40°C.

También el valor del pH en la etapa b) debe considerar los requisitos de posibles reacciones que discurran al mismo tiempo, de la transferencia de sustancias del compuesto orgánico disuelto en la fase del intercambiador de iones líquido, de la estabilidad de eductos, productos, productos intermedios o agentes. De acuerdo con la invención, el valor del pH asciende a 6 hasta 8, preferiblemente a 6,2 hasta 7,2. Eventualmente, es necesario mantener constante el valor del pH en la solución acuosa o bien controlarle o regularle y, con ello, aportar agentes de corrección (p. ej., agua amoniacal/gas amoníaco, ácido sulfúrico, o similares).

Con el fin de transformar el compuesto orgánico de la fase acuosa lo más completamente posible a la fase orgánica, es necesaria una cantidad suficiente del intercambiador de cationes hidrofóbico líquido. En una forma de realización preferida de la presente invención, la proporción cuantitativa de ingredientes de intercambiador de cationes líquido y compuesto orgánico en al menos una etapa, en el caso de un proceso continuo sumada a lo largo de todo el transcurso de la reacción, es al menos 1, es decir, por cada molécula del compuesto orgánico se emplea al menos una molécula de intercambiador de cationes hidrofóbico líquido. En una forma de realización todavía más preferida, la relación es mayor que 2, 3, 5, 10, 15 o 20, preferiblemente es de 1,5 a 3.

La relación en volumen de la solución orgánica a la solución acuosa, junto con la proporción cuantitativa de ingredientes intercambiador de cationes/compuesto orgánico, es importante para un procedimiento eficiente. En una forma de realización particular, asciende a 100:1 hasta 1:100, preferiblemente a 20:1 hasta 1:20, todavía más preferiblemente a 10:1 hasta 1:10, 4:1 hasta 1:4, 3:1 hasta 1:3 o lo más preferiblemente a 1:2 hasta 2:1.

Junto al intercambiador de cationes hidrofóbico líquido, la fase orgánica hidrofóbica puede contener, además, un disolvente hidrofóbico. Esto puede servir para aumentar la capacidad de absorción de un intercambiador de cationes hidrofóbico líquido en la fase hidrofóbica e impedir un comportamiento indeseado, por ejemplo una separación por floculación. En una forma de realización preferida, en el caso del disolvente se trata de un educto de una reacción que discurre en solución acuosa, lo más fuertemente preferido, el sustrato de una reacción catalizada por enzimas que discurren en la solución acuosa. En una forma de realización preferida, se trata de un éster de ácido graso. En una forma de realización particularmente preferida, en el caso del disolvente se trata de un éster de ácido graso, preferiblemente el éster metílico, de un ácido graso que sirve como intercambiador de cationes hidrofóbico líquido. También pueden utilizarse mezclas de más de un disolvente y uno o más de un intercambiador de cationes hidrofóbico líquido como solución orgánica hidrofóbica.

La proporción del disolvente, en la medida en que esté presente, en la fase orgánica hidrofóbica asciende, en una forma de realización preferida, a 1 hasta 99 por ciento en volumen (% en vol.). En una forma de realización preferida, la proporción del disolvente asciende a 10 hasta 90, todavía más preferiblemente a 20 hasta 80, lo más preferiblemente a 25 a 75 % en vol.

En una forma de realización preferida, en el caso de la célula metabólicamente activa se trata de una célula recombinante que está dotada de enzimas para la preparación del compuesto de la fórmula (I) o (II) y que sobre-expresa al menos una de ellas, preferiblemente todas. Enzimas adecuadas que se pueden utilizar para la preparación de compuestos orgánicos de la fórmula (I) o (II), en particular alcano hidroxilasas, AlkL, transaminasas, aldehído deshidrogenasas y alanina deshidrogenasas, se describen en el estado de la técnica, por ejemplo, en el documento DE 10200710060705, el documento EP 11004029 o en el documento PCT/EP 2011/053834. En una forma de realización preferida, por la expresión "célula metabólicamente activa", tal como se utiliza en esta memoria, se entiende una célula viva con actividad metabólica, preferiblemente una célula que expresa, o todavía más preferiblemente sobre-expresa una enzima en forma activa, relevante para la preparación biotecnológica del producto de interés. En el caso de la célula se puede tratar de un procarionte, incluidas arqueas, o de un eucariote, en el caso de un procarionte, preferiblemente del grupo de géneros que comprenden *Pseudomonas*, *Corynebacterium* y *Escherichia*. En una forma de realización todavía más preferida, en el caso de la célula se trata de una célula bacteriana, todavía más preferiblemente de una célula bacteriana Gram-negativa, lo más preferiblemente de *E. coli*. En otra forma de realización preferida, se trata de una célula eucariote, preferiblemente de una célula de hongos, todavía más preferiblemente de una célula de levadura, lo más preferiblemente de *Saccharomyces* o *Candida*, *Pichia*, en particular *Candida tropicalis*. En una forma de realización preferida, la expresión "eucariote inferior", tal como se utiliza en esta memoria, significa un eucariote unicelular en todas las fases de su existencia, a diferencia de eucariotes superiores que en la parte predominante de su vida la discurren en forma de un organismo pluricelular con tejidos que comprenden células diferenciadas. El término "célula" se utiliza, en una forma de realización particular, en esta solicitud con el mismo significado y de manera indistinta con el término "microorganismo". Además, en el caso de la célula se puede tratar de una célula aislada o de una mezcla de diferentes células.

El procedimiento se puede utilizar para primeramente oxidar y a continuación aminor ácidos grasos o sus ésteres. Para ello se adecua, por ejemplo, un sistema enzimático tal como se describe en la solicitud de patente internacional WO 2009/077461. En el caso de la célula metabólicamente activa se trata en este caso de una célula que presenta una alcano hidroxilasa recombinante y una transaminasa, preferiblemente además de ello, al menos una enzima del grupo que comprenden alcohol deshidrogenasa, alanina deshidrogenasa y lactama hidrolasa.

En la forma de realización más preferida, en el caso del alcano hidroxilasa se trata de una alcano hidroxilasa del tipo AlkB. AlkB representa una oxidorreductasa del sistema AlkBGT de *Pseudomonas putida*, que es conocida por su actividad de hidroxilasa. Ésta depende de otros dos polipéptidos, AlkG y AlkT, que se co-expresan preferiblemente. AlkT se caracteriza como una rubredoxina reductasa dependiente de FAD, que da electrones de NADH a AlkG. AlkG es una rubredoxina, una proteína redox con contenido en hierro, que actúa como donante de electrones directo para AlkB. En una forma de realización preferida, por la expresión "alcano hidroxilasa del tipo alkB", tal como se utiliza en esta memoria, se entiende una alcanomonooxidasa situada en la membrana. En otra forma de realización preferida, por la misma expresión "alcano hidroxilasa del tipo alkB" se entiende un polipéptido con una homología de la secuencia de manera crecientemente preferida de al menos 75, 80, 85, 90, 92, 94, 96, 98 o 99 % con respecto a la secuencia de Gpo1 de *Pseudomonas putida* (código del banco de datos: CAB 54050.1). En otra forma de realización preferida, por la expresión se entiende una monooxigenasa independiente del citocromo. En otra forma de realización preferida, por la expresión "alcano hidroxilasa del tipo alkB" 5 se entiende una monooxigenasa independiente del citocromo que utiliza al menos una rubredoxina u homólogo como donante de electrones. En una forma de realización particularmente preferida, por la expresión se entiende un alcano hidroxilasa situada en la membrana, independiente del citocromo, con de manera crecientemente preferida al menos 60, 70, 80, 80, 85, 90, 92, 94, 96, 98 o 99 % con respecto a la secuencia de AlkB de Gpo1 de *Pseudomonas putida*, que como donante de electrones requiere al menos AlkG (CAB 54052.1), pero preferiblemente la combinación de AlkG con la reductasa AlkT (CAB 54063.1), pudiéndose tratar en el caso de AlkG y/o AlkT también de un homólogo del polipéptido

respectivo. El término “secuencia”, tal como se utiliza en esta memoria, se puede referir a la secuencia de aminoácidos de un polipéptido y/o de la secuencia de ácidos nucleicos que lo codifican. En una forma de realización preferida adicional, en el caso de una “alcano hidroxilasa del tipo alkB”, tal como se utiliza en esta memoria, se trata de una oxidorreductasa independiente del citocromo, es decir una oxidorreductasa que no comprende citocromo como co-factor. En el caso de todos los códigos del banco de datos indicados en esta solicitud, se trata de códigos de los Bancos de Datos de NCBI en la versión disponible en línea el 1 de agosto de 2012.

En una forma de realización preferida, por el término “alcohol deshidrogenasa”, tal como se utiliza en esta memoria, se entiende una enzima que reduce un aldehído o bien una cetona en el correspondiente alcohol primario o bien secundario. Ejemplos comprenden las alcohol deshidrogenasas de *Ralstonia eutropha* (ACB 78191.1), *Lactobacillus brevis* (YP_795183.1), *Lactobacillus kefirii* (ACF95832.1), de hígado de caballo, de *Paracoccus pantotrophus* (ACB78182.1) y *Sphingobium yanoikuyae* (EU427523.1), así como sus respectivas variantes.

En una forma de realización preferida, por el término “transaminasa”, tal como se utiliza en esta memoria, se entiende una enzima que cataliza la transferencia de grupos amino de una molécula donante, preferiblemente un aminoácido, a una molécula aceptora, preferiblemente un ácido α -cetocarboxílico. Por ejemplo, se puede utilizar la transaminasa de *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 (código del banco de datos NP_901695).

En una forma de realización preferida, por el término “alanina deshidrogenasa”, tal como se utiliza en esta memoria, se entiende una enzima que cataliza la transformación de L-alanina, con el consumo de agua y NAD^+ , en piruvato, amoníaco y NADH. Por ejemplo, pueden utilizarse las alanina deshidrogenasas de *Bacillus subtilis* (código del banco de datos L20916), *Rhizobium leguminosarum* (código del banco de datos CP001622), *Vibrio proteolyticus* (código del banco de datos AF070716), *Mycobacterium tuberculosis* (código del banco de datos X63069), *Enterobacter aerogenes* (código del banco de datos AB013821).

En la forma de realización más preferida, en el caso de la alcano hidroxilasa se trata de una alcano hidroxilasa del tipo AlkB. AlkB representa una oxidorreductasa del sistema AlkBGT de *Pseudomonas putida*, que es conocida por su actividad de hidroxilasa. Ésta depende de otros dos polipéptidos, AlkG y AlkT que son preferiblemente co-expresados. AlkT se caracteriza como una rubredoxina-reductasa dependiente de FAD, que transmite electrones de NADH a AlkG. AlkG es una rubredoxina, una proteína redox con contenido en hierro, que actúa como donante de electrones directo para AlkB. En una forma de realización preferida, por la expresión “alcano hidroxilasa del tipo alkB”, tal como se utiliza en esta memoria, se entiende una alcanomonooxidasa situada en la membrana. En una forma de realización preferida adicional, por la misma expresión “alcano hidroxilasa del tipo alkB” se entiende un polipéptido con una homología de la secuencia de manera crecientemente preferida de al menos 75, 80, 85, 90, 92, 94, 96, 98 o 99 % con respecto a la secuencia de AlkB de Gpo1 de *Pseudomonas putida* (código del banco de datos: CAB54050.1). En otra forma de realización preferida, por la expresión se entiende una monooxigenasa independiente del citocromo. En otra forma de realización preferida, por la expresión “alcano hidroxilasa del tipo alkB” 5 se entiende una monooxigenasa independiente del citocromo que utiliza al menos una rubredoxina u homólogo como donante de electrones. En una forma de realización particularmente preferida, por la expresión se entiende una alcano hidroxilasa situada en la membrana e independiente del citocromo con de manera crecientemente preferida al menos 60, 70, 80, 80, 85, 90, 92, 94, 96, 98 o 99 % con respecto a la secuencia del AlkB de Gpo1 de *Pseudomonas putida* que como donante de electrones requiere al menos AlkG (CAB 54052.1), pero preferiblemente la combinación de AlkG con la reductasa AlkT (CAB54063.1), pudiéndose tratar de alK G y/o de alK T también de un homólogo del polipéptido respectivo. El término “secuencia” tal como se utiliza en esta memoria, se puede referir a la secuencia de aminoácidos de un polipéptido y/o a la secuencia de ácidos nucleicos que lo codifican. En otra forma de realización preferida, en el caso de una “alcano hidroxilasa del tipo alkB” se trata, tal como se utiliza en esta memoria, de una oxidorreductasa independiente del citocromo, es decir, una oxidorreductasa que no comprende citocromo como co-factor.

En otra forma de realización preferida, en el caso de la alcano hidroxilasa se trata de una citocromo P450-monooxigenasa de la familia CYP153. En una forma de realización preferida, por la expresión “citocromo P450-monooxigenasa de la familia CYP153” se entiende una oxidasa citosólica que es parte de un sistema de 3 componentes que comprende, además, una ferredoxina y una ferredoxina-reductasa, con un sitio de unión a alcano y con la capacidad de hidrolizar alcanos. En una forma de realización particularmente preferida, se trata de una enzima que presenta, en al menos un 80, preferiblemente un 90, lo más preferiblemente un 95 o 99 por ciento de identidad de la secuencia con la citocromo P450-monooxigenasa de la familia CYP153 de *Alcanivorax borkumensis* SK2 (código del banco de datos YP_691921), o de una enzima que comprende una secuencia de polipéptidos que presenta al menos un 80, preferiblemente un 90, lo más preferiblemente un 95 o 99 por ciento de identidad de la secuencia con la citocromo P450-monooxigenasa de la familia CYP153 de *Alcanivorax borkumensis* SK2 (código del banco de datos YP_691921) y, además de ello, presenta actividad de alcano hidroxilasa. En una forma de realización preferida, por la expresión “actividad de alcano hidroxilasa”, tal como se utiliza en esta memoria, se entiende la capacidad de catalizar la hidroxilación de alcanos o radicales alquilo lineales no sustituidos que

comprenden al menos cinco, preferiblemente doce radicales hidrocarbonados. En otra forma de realización preferida, por la expresión “citocromo P450-monooxigenasa de la familia CYP153” se entiende una oxidasa no ligada a membrana que comprende un punto de unión para alcanos, radicales alquilo lineales no sustituidos que comprenden al menos cinco, preferiblemente doce radicales hidrocarbonados o alcanos hidroxilados una vez, y cuya cadena polipeptídica abarca el motivo LL(I/L)(V/I)GGNDTTRN. En una forma de realización preferida, en el caso de una “citocromo P450-monooxigenasa de la familia CYP153”, tal como se utiliza en esta memoria, se entiende una citocromo P450-monooxigenasa de la familia CYP153 de *Alcanivorax borkumensis* SK2 (código del banco de datos YP_691921) o de una variante que presenta preferiblemente actividad de alcano hidroxilasa.

Para el abastecimiento óptimo de la citocromo P450-monooxigenasa de la familia CYP153 con electrones a partir del agente reductor, preferiblemente NADH, se prefiere que la monooxigenasa se utilice conjuntamente con ferredoxina-reductasa que interactúa funcionalmente con ella y ferredoxina que interactúa funcionalmente con ella. En este caso, se puede tratar de polipéptidos aislados o, en el caso de utilizar una célula metabólicamente activa, de polipéptidos co-expresados o de polipéptidos fusionados en el extremo N o C con la citocromo P450-monooxigenasa de la familia CYP153. El que una ferredoxina-reductasa o una ferredoxina interactúe funcionalmente con una citocromo P450-monooxigenasa de la familia CYP153 dada entre sí, el experto en la materia lo puede comprobar fácilmente debido a que el agente reductor es oxidado en presencia de un sustrato de alcano o de los tres polipéptidos. Alternativamente, puede utilizarse el ensayo enzimático descrito por Scheps, D., Malca, H., Hoffmann, B., Nestl, B. M. y Hauer, B. (2011) *Org. Biomol. Chem.* 9, 6727, el cual en el caso de polipéptidos que interactúan funcionalmente, muestra un claro aumento de la velocidad de la reacción. En una forma de realización particularmente preferida, la citocromo P450-monooxigenasa de la familia CYP153, la ferredoxina y la ferredoxina-reductasa proceden del mismo organismo. En una forma de realización particularmente preferida, en el caso de la ferredoxina-reductasa se trata de *Alcanivorax borkumensis* SK2 (código del banco de datos YP_691923) o de una variante de la misma, de la ferredoxina de *Alcanivorax borkumensis* SK2 (código del banco de datos YP_691920) o de una variante de la misma y de la citocromo P450-monooxigenasa de la familia CYP153 de *Alcanivorax borkumensis* SK2 (código del banco de datos YP_691921) o de una variante de la misma.

La enseñanza de la presente invención no solo se puede realizar o bien aplicar utilizando la o bien las secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos exactas de las macromoléculas biológicas descritas en esta memoria, por ejemplo mediante inactivación de un gen que codifica una enzima que cataliza las reacciones de la β -oxidación, sino también utilizando variantes de macromoléculas de este tipo que pueden ser obtenidas por delección, adición o sustitución de uno o más de un aminoácido o ácido nucleico. En una forma de realización preferida, el término “variante” de una secuencia de ácidos nucleicos o secuencia de aminoácidos, en lo que sigue utilizado con el mismo significado y de manera intercambiable con el término “homólogo”, tal como se utiliza en esta memoria, significa otra secuencia de ácidos nucleicos o aminoácidos que, con relación a la secuencia de ácidos nucleicos o de aminoácidos de tipo salvaje original correspondiente presenta una homología, utilizada aquí con el mismo significado de identidad, de 70, 75, 80, 85, 90, 92, 94, 96, 98, 99 % o mayor porcentaje, en donde preferiblemente están suprimidos o sustituidos otros aminoácidos que los que configuran el centro catalíticamente activo o aminoácidos esenciales para la estructura o el plegamiento, o estos últimos están únicamente sustituidos de forma conservativa, por ejemplo un glutamato en lugar de un aspartato o una leucina en lugar de una valina. El estado de la técnica describe algoritmos que pueden utilizarse con el fin de calcular la magnitud de homología de dos secuencias, p. ej., Arthur Lesk (2008), *Introduction to bioinformatics*, 3ª edición. En otra forma de realización preferida de la presente invención, la variante de una secuencia de aminoácidos o de ácidos nucleicos presenta, preferiblemente de manera adicional a la homología de la secuencia arriba mencionada, esencialmente la misma actividad enzimática de la molécula de tipo salvaje o bien de la molécula original. Por ejemplo, una variante de un polipéptido enzimáticamente activo como proteasa presenta la misma o esencialmente la misma actividad proteolítica que la enzima polipeptídica, es decir, la capacidad de catalizar la hidrólisis de un enlace péptido. En una forma de realización particular, la expresión “esencialmente la misma actividad enzimática” significa una actividad con relación a los sustratos del polipéptido de tipo salvaje que se encuentra claramente por encima de la actividad de fondo y/o se diferencia en menos de 3, preferiblemente 2, todavía más preferiblemente un orden de magnitud de los valores K_M y/o K_{cat} , que presenta el polipéptido de tipo salvaje con relación a los mismos sustratos. En otra forma de realización preferida, el término “variante” de una secuencia de ácidos nucleicos o de aminoácidos comprende al menos una parte/o fragmento activo de la secuencia de ácidos nucleicos o bien aminoácidos. En otra forma de realización preferida, la expresión “parte activa”, tal como se utiliza en esta memoria, significa una secuencia de aminoácidos o una secuencia de ácidos nucleicos que presenta una longitud menor que la longitud completa de la secuencia de aminoácidos o bien codifica una longitud menor que la longitud completa de la secuencia de aminoácidos, presentando la secuencia de aminoácidos o la secuencia de aminoácidos codificada con una longitud menor que la secuencia de aminoácidos de tipo salvaje esencialmente la misma actividad enzimática que el polipéptido de tipo salvaje o una variante del mismo, por ejemplo como importador de ácidos grasos, como enoil-CoA-hidratasa o bien FadE o como acetil-CoA-aciltransferasa o bien FadB. En una forma de realización particular, el término “variante” de un ácido nucleico comprende un ácido nucleico, cuya cadena complementaria, preferiblemente bajo condiciones rigurosas, se une al ácido nucleico de tipo salvaje. La rigurosidad de la reacción de hibridación es fácilmente determinable por el experto

en la materia y depende, en general, de la longitud de la sonda, de las temperaturas durante el lavado y de la concentración de las sales. En general, sondas largas requieren temperaturas más altas para la hibridación, mientras que, por el contrario, sondas más cortas se contentan con temperaturas más bajas. El que tenga lugar la hibridación depende en general de la capacidad del ADN desnaturalizado de asociarse a cadenas complementarias que estén presentes en su entorno, a saber por debajo de la temperatura de fusión. La rigurosidad de la reacción de hibridación y correspondientes condiciones se describen con mayor detalle en Ausubel *et al.* 1995. Instrucciones para la identificación de secuencias de ADN por medio de hibridación las encuentra el experto en la materia, entre otros, en el libro de texto "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" de la razón social Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Alemania, 1993) y en Liebl *et al.* (International Journal of Systematic Bacteriology 41: 255-260 (1991)). La hibridación tiene lugar en una forma de realización preferida bajo condiciones rigurosas, es decir, solo se forman híbridos en los que la sonda y la secuencia diana, es decir, los polinucleótidos tratados con la sonda, son al menos un 70% idénticas. Es conocido, que la rigurosidad de la hibridación, incluidas las etapas de lavado, puede influenciarse o bien determinarse mediante variación de la composición tampón, la temperatura y la concentración de sales. La reacción de hibridación se lleva a cabo en general a una rigurosidad relativamente baja en comparación con las etapas de lavado (Hybaid Hybridisation Guide, Hybaid Limited, Teddington, Reino Unido, 1996). Para la reacción de hibridación puede emplearse, por ejemplo, un tampón correspondiente al tampón 5x SSC a una temperatura de aprox. 50 °C – 68 °C. En este caso, pueden hibridarse sondas también con polinucleótidos que presenten menos de un 70% de identidad con la secuencia de la sonda. Híbridos de este tipo son menos estables y se separan mediante lavado bajo condiciones rigurosas. Esto puede alcanzarse, por ejemplo, reduciendo la concentración de sales a 2x SSC y eventualmente de forma subsiguiente a 0,5x SSC (The DIG System User's Guide for Filter Hybridisation, Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania, 1995), ajustándose una temperatura en la secuencia de preferencia creciente de 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. Se prefieren intervalos de temperaturas de aprox. 64°C – 68°C o de aprox. 66°C – 68°C. Eventualmente, es posible reducir la concentración de sales hasta una concentración correspondiente a 0,2x SSC o a 0,1x SSC. Mediante el aumento escalonado de la temperatura de hibridación en pasos de aprox. 1 – 2°C de 50°C a 68°C, pueden aislarse fragmentos de polinucleótidos que, por ejemplo en la secuencia de preferencia creciente, presentan al menos 70%, o al menos 80%, o al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad con la secuencia de la molécula de ácido nucleico empleada. Otras instrucciones para la hibridación se pueden adquirir en el comercio en forma de los denominados kits (p. ej., DIG Easy Hyb de la razón social Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, N° de catálogo 1603558). En una forma de realización preferida, el término "variante" de un ácido nucleico, tal como se utiliza en esta memoria, comprende una secuencia de ácidos nucleicos arbitraria que codifica la misma secuencia de aminoácidos que el ácido nucleico original o una variante de esta secuencia de aminoácidos en el marco de la degenerabilidad del código genético.

Después de la segunda etapa, la solución orgánica hidrofóbica se separa del medio de cultivo acuoso. Esto es, en virtud de la capacidad inherente de este sistema para la configuración de dos fases, un proceso fácilmente a realizar por el experto en la materia, el cual puede partir simplemente mediante el reposo del recipiente y subsiguiente separación por decantación de una fase. Alternativamente, puede encontrar uso un embudo de separación. En el caso de puntos de ebullición suficientemente diferentes, existe la posibilidad de eliminar la fase que bulle a temperaturas más bajas, la cual se trata, por norma general, de la fase orgánica, mediante la aplicación de depresión. Cantidades menores de agua que permanecen en la fase orgánica, pueden separarse mediante el uso de agentes de secado inorgánicos tales como hidruro de calcio, cloruro de calcio anhidro, gel de sílice, sulfato de sodio anhidro, hidróxido de sodio o similares.

Otras instrucciones para la realización de la invención pueden deducirse del documento PCT/EP 2011/071491, en donde los ácidos grasos allí descritos han de ser reemplazados por los de acuerdo con la invención.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para separar un compuesto orgánico de una solución acuosa, que comprende las etapas
- 5 a) proporcionar la solución acuosa que contiene el compuesto orgánico, y una solución orgánica hidrofóbica, comprendiendo esta última un intercambiador de cationes hidrofóbico líquido, b) poner en contacto la solución acuosa y la solución orgánica hidrofóbica, y c) separar la solución orgánica hidrofóbica de la solución acuosa, en donde en el caso del intercambiador de cationes hidrofóbico líquido se trata de un ácido alcanoico saturado con al menos un sustituyente alquilo que presenta al menos 12 átomos de carbono, tratándose el compuesto orgánico de un compuesto de la fórmula
- 10
$$\text{NR}^2\text{R}^3\text{H}^+ - \text{A} - \text{NR}^4\text{R}^5\text{H}^+ \text{ (II)},$$
- en donde A es un grupo alquileo con al menos tres, preferiblemente al menos seis, de manera particularmente preferida ocho átomos de carbono, que preferiblemente no está sustituido y es de cadena lineal, y en donde R², R³, R⁴ y R⁵, en cada caso e independientemente uno de otro, se eligen del grupo que comprende hidrógeno, metilo, etilo y propilo;
- 15 en donde el valor del pH en la solución acuosa en la etapa b) asciende a 6 a 8, preferiblemente a 6,2 a 7,2.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la proporción cuantitativa de ingredientes de intercambiador de cationes líquido a compuesto orgánico en la etapa b) asciende a al menos 1.
3. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 2, en el que la relación en volumen de solución orgánica a solución acuosa asciende a 1:10 hasta 10:1.
- 20 4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el intercambiador de cationes líquido es un ácido graso ramificado de la fórmula (H₃C)₂CH-(CH₂)_n-COOH o una forma no protonada de la misma y n es al menos 4, preferiblemente al menos 8 y lo más preferiblemente es 14.
5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el intercambiador de cationes líquido es un ácido graso ramificado que comprende exclusivamente sustituyentes distintos de los sustituyentes cíclicos.
- 25 6. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la solución acuosa comprende, además, una célula metabólicamente activa.
7. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la solución orgánica contiene, además de ello, al menos un disolvente orgánico, preferiblemente un ácido graso y/o un éster de ácido graso.
8. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que la solución orgánica hidrofóbica contiene al intercambiador de cationes hidrofóbico líquido en una proporción en volumen de 20 a 80%, preferiblemente de 25 a 75%.
- 30 9. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 8, en el que en el caso del compuesto orgánico se trata de una diamina del grupo que comprende 1,4-butandiamina, 1,5-pentandiamina, 1,6-hexandiamina, 1,8-octandiamina, 1,14-tetradecandiamina, 1,18-octadecandiamina, 2-metil-1,5-diaminopentano, 2,2-dimetil-1,5-diaminopentano, 4,4'-diaminodiclohexilmetano, 3,3'-dimetil-4,4'-diaminodiclohexilmetano, 3,3',5,5'-tetrametil-4,4'-diaminodiclohexilmetano, 2,2,4- o 2,4,4-trimetilhexametilendiamina, 1,4-diaminociclohexano, 4,4'-diaminodiclohexilpropano e isoforondiamina.
- 35 10. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la temperatura en la etapa b) oscila entre 28 y 70 °C, preferiblemente entre 30 y 37 °C.
- 40 11. Mezcla de reacción que comprende una solución acuosa que contiene un compuesto orgánico, y una solución orgánica hidrofóbica, comprendiendo la solución orgánica hidrofóbica un intercambiador de cationes hidrofóbico líquido, en donde en el caso del intercambiador de cationes hidrofóbico líquido se trata de un ácido alcanoico saturado con al menos un sustituyente alquilo que presenta al menos 12 átomos de carbono, tratándose el compuesto orgánico de un compuesto de la fórmula
- 45
$$\text{NR}^2\text{R}^3\text{H}^+ - \text{A} - \text{NR}^4\text{R}^5\text{H}^+ \text{ (II)},$$
- en donde A es un grupo alquileo con al menos tres, preferiblemente al menos seis, de manera particularmente preferida ocho átomos de carbono, que preferiblemente no está sustituido y es de cadena lineal, y en donde R², R³, R⁴ y R⁵, en cada caso e independientemente uno de otro, se eligen del grupo que comprende hidrógeno, metilo, etilo y propilo;

en donde el valor del pH en la solución acuosa asciende a 6 a 8, preferiblemente a 6,2 a 7,2.

12. Mezcla de reacción según la reivindicación 11, en donde el intercambiador de cationes hidrofóbico líquido es un ácido graso ramificado de la fórmula $(\text{H}_3\text{C})_2\text{CH}-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$ o una forma no protonada de la misma y n es al menos 4, preferiblemente al menos 8 y lo más preferiblemente es 14.

5 13. Mezcla de reacción según una de las reivindicaciones 11 a 12, en donde el intercambiador de cationes líquido es un ácido graso ramificado que comprende exclusivamente sustituyentes distintos de los sustituyentes cíclicos.

14. Mezcla de reacción según una de las reivindicaciones 11 a 13, en donde la solución acuosa comprende, además, una célula metabólicamente activa.

10 15. Mezcla de reacción según una de las reivindicaciones 11 a 14, en donde en el caso del compuesto orgánico se trata de una diamina del grupo que comprende butandiamina, 1,5-pentandiamina, 1,6-hexandiamina, 1,8-octandiamina, 1,14-tetradecandiamina, 1,18-octadecandiamina, 2-metil-1,5-diaminopentano, 2,2-dimetil-1,5-diaminopentano, 4,4'-diaminod ciclohexilmetano, 3,3'-dimetil-4,4'-diaminod ciclohexilmetano, 3,3',5,5'-tetrametil-4,4'-diaminod ciclohexilmetano, 2.2.4- o 2.4.4-trimetilhexametildiamina, 1.4-diaminociclohexano, 4.4'-diaminod ciclohexilpropano e isoforondiamina.