

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 834 978**

51 Int. Cl.:

**C12P 5/00** (2006.01)

**C12M 1/34** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.07.2014 PCT/NL2014/000020**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.01.2015 WO15002528**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.07.2014 E 14761704 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.09.2020 EP 3017050**

54 Título: **Proceso de fermentación de dos fases para la producción de un isoprenoide**

30 Prioridad:

**04.07.2013 EP 13003384**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**21.06.2021**

73 Titular/es:

**ISOBIONICS B.V. (100.0%)  
Urmonderbaan 22  
6167 RD Geleen, NL**

72 Inventor/es:

**JANSSEN, ANTONIUS CORNELIS JOHANNES  
MATHEUS;  
KIERKELS, JOANNES GERARDUS THEODORUS  
y  
LENTZEN, GEORG FRIEDRICH**

74 Agente/Representante:

**VIDAL GONZÁLEZ, Maria Ester**

ES 2 834 978 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

Proceso de fermentación de dos fases para la producción de un isoprenoide

5 La invención se refiere a un proceso de fermentación de dos fases para producir un compuesto orgánico, en particular un isoprenoide.

10 Los isoprenoides (también conocidos como terpenoides o terpenos) son una clase grande y diversa de compuestos orgánicos de origen natural que encuentran utilidad potencial, entre otras cosas, en la producción de productos farmacéuticos, cosméticos, perfumes, saborizantes, suplementos alimenticios para animales y nutracéuticos.

15 Los métodos de producción convencionales implican, por ejemplo, la extracción de estos compuestos a partir de plantas, microbios y animales. Sin embargo, estos métodos de extracción adolecen de numerosas limitaciones, tales como el bajo rendimiento de extracción, la falta de flexibilidad de los organismos fuente para el cultivo a gran escala y los métodos de producción complicados. Además, los métodos de síntesis química para producir isoprenoides no son lucrativos debido al alto costo de los materiales de partida y que requieren de extensas etapas de purificación del producto. También se han explorado enfoques enzimáticos in vitro, pero la explotación de este enfoque está restringida, por ejemplo, por la disponibilidad limitada de los precursores.

20 Se cree que la ingeniería metabólica de microorganismos para la producción de isoprenoides es más prometedora para la producción de grandes cantidades de isoprenoides a partir de fuentes de carbono baratas en procesos de fermentación, aunque aún deben superarse algunos obstáculos (revisado en Ajikumar y otros, *Mol. Pharmaceutics*, 2008, 5 (2), 167-190). La producción de isoprenoides a través de la fermentación de microorganismos se considera más conveniente que los métodos tradicionales, ya que cumple con el requisito de una producción sostenible de una manera más económica, escalable industrialmente y productiva. La producción de isoprenoides a través de métodos de fermentación representa una tecnología de proceso alternativa que utiliza un menor costo de materia prima y tiene una mayor productividad, lo que ofrece un potencial para un menor costo de fabricación. La producción convencional de isoprenoides por fermentación se describe, por ejemplo, en los documentos WO2011/060057 A1 (taxadieno con una célula de *E. coli*) y US2010/145116 A1 (carotenoides con bacterias que pertenecen a una variedad de géneros).

35 Uno de los problemas que se encuentran con más frecuencia en los procedimientos de fermentación es la inhibición por el producto final, es decir, los microorganismos responsables de la fermentación pueden verse afectados por el producto de fermentación, por ejemplo, porque el producto de fermentación es citotóxico. La acumulación del producto más allá de una concentración crítica inactiva el microorganismo y disminuye sustancialmente la tasa de productividad. Este fenómeno es particularmente relevante en la producción de isoprenoides, ya que la mayoría de los microbios se destruyen o inactivan en presencia de estos compuestos citotóxicos, lo que plantea una grave limitación para obtener cepas altamente productivas. Debido a que estos compuestos no se obtienen más allá de una concentración crítica, pueden requerirse etapas adicionales de concentración y purificación, lo que hace que el proceso sea engorroso y costoso.

45 Otro gran inconveniente es que los isoprenoides, al ser compuestos orgánicos altamente volátiles, son poco solubles en soluciones acuosas. Por lo tanto, la pérdida de producto durante la fermentación a través de los gases de escape es un problema importante en el desarrollo de un proceso económicamente viable (Asadollahi y otros, *Biotech Bioengin* 2007, 99(3): 666-677). En estudios anteriores, los terpenoides sintetizados en *E. coli* se perdieron en parte por evaporación debido a su carácter altamente volátil (Newman y otros, *Biotechnol. Bioeng.* (2006) 95: 684-691).

50 Para superar los inconvenientes mencionados anteriormente, se ha intentado extraer el producto del medio de fermentación a medida que avanza la fermentación, de manera que la concentración del producto no aumente hasta un punto en el que se inhiba la biosíntesis del producto, lo que asegura de esta manera un período sostenido de alta tasa de productividad. Uno de esos intentos utiliza un líquido que es inmiscible con el medio de fermentación acuoso pero que es un extractante para el producto deseado. El producto objetivo se reparte entre el extractante y el medio de fermentación acuoso cuando los dos se ponen en contacto, lo que reduce de esta manera la concentración del producto en el medio acuoso. Se ha intentado la separación in situ del producto liberado que se realiza en una fermentación de dos fases mediante el uso de un solvente orgánico como la fase secundaria para mitigar los inconvenientes de los métodos de fermentación convencionales. (Malinowski, *Biotech Advances* 2001, 19: 525-538).

60 En la práctica, los sistemas de fermentación extractiva de dos fases son complejos debido a la naturaleza impredecible de estos sistemas, particularmente para la producción a gran escala. Uno de los desafíos más importantes es la selección del sistema de solvente adecuado para una combinación de producto/microorganismo dada. Una dificultad que se encuentra con frecuencia, por ejemplo, es que los solventes inmiscibles en agua más comunes son tóxicos para los microorganismos y/o peligrosos, lo que los hace inadecuados para la producción a escala comercial de productos tales como isoprenoides a través de fermentación. También se ha encontrado que ciertos solventes forman emulsiones estables con el medio de fermentación acuoso, lo que provoca dificultades de separación, bloqueo del equipo, etc. La selección de un solvente portador orgánico biocompatible con coeficientes de reparto favorables es, por lo tanto, crucial para la implementación de una bioconversión eficaz en un sistema

bifásico orgánico-acuoso (Cruz y otros, 2004; Leon y otros, 1998). Preferentemente, el solvente tiene otras características de solvente portador convenientes, tales como baja tendencia a la formación de emulsión, estabilidad química, térmica y biológica.

5 Típicamente, la adición de solventes durante el proceso de fermentación implica la adición de grandes volúmenes de un solvente orgánico en un intervalo de tiempo corto que, por ejemplo, implica el riesgo de introducir contaminantes potenciales en el medio. Una pérdida de esterilidad de la fermentación tiene graves consecuencias que afectan los costos de producción, los cronogramas y afectan la calidad y cantidad del producto. Aparte del riesgo de introducir contaminación, los extractantes afectan gravemente la estabilidad de las señales a partir de sondas cruciales como, por ejemplo, electrodo de pH y sonda de oxígeno disuelto, lo que interfiere con la medición precisa de parámetros importantes como el pH y el contenido de oxígeno disuelto del medio. Esto es más común durante el empleo de solventes orgánicos como extractantes, ya que el oxígeno tiene generalmente una mayor solubilidad en solventes orgánicos. Por lo tanto, la adición de solventes orgánicos durante la fermentación tiene un impacto importante en la medición precisa de parámetros cruciales tales como el pH y el oxígeno disuelto que se requieren para controlar la fermentación.

Estas limitaciones han obstaculizado las posibilidades de usar solventes inmiscibles en agua durante la fermentación para la producción a escala industrial de los productos objetivo. Por lo tanto, existe la necesidad de un proceso de fermentación escalable industrialmente para la producción de compuestos orgánicos, en particular isoprenoides en presencia de un solvente inmiscible en agua. Además, existe la necesidad de producir estos compuestos con un buen rendimiento y productividad con una baja tendencia a acumular niveles tóxicos de intermediarios metabólicos.

Por lo tanto, un objetivo de la presente invención es proporcionar un método de fermentación para producir compuestos orgánicos, en particular isoprenoides, que satisfaga esta necesidad. Es un objetivo de la presente invención abordar específicamente los desafíos asociados con la utilización de solventes inmiscibles en agua en procesos de fermentación a escala industrial.

Es un objetivo particular de la presente invención proporcionar un método robusto y escalable industrialmente para la producción de isoprenoides que permita la utilización de solventes orgánicos como extractantes.

Un objetivo adicional de la presente invención es proporcionar un proceso de fermentación eficiente para la producción a escala industrial de un isoprenoide, mediante el empleo de un sistema líquido-líquido de dos fases por un período de alta productividad sostenido.

35 Se ha descubierto ahora que este objetivo puede lograrse al añadir un solvente orgánico inmiscible en agua a un medio acuoso para cultivar células para formar un sistema de dos fases. Una relación optimizada del solvente orgánico inmiscible en agua con respecto al medio acuoso facilita la extracción selectiva del compuesto objetivo en extractantes orgánicos específicos durante la fermentación.

40 Como se describe, el proceso de fermentación a escala industrial es particularmente adecuado para usarse para la producción de un isoprenoide, ya que tiene como objetivo resolver los problemas asociados generalmente con estos compuestos altamente volátiles y citotóxicos. Sin embargo, el proceso es igualmente muy adecuado para usarse para la producción de otros compuestos orgánicos que presentan desafíos de proceso similares.

45 En consecuencia, la presente invención proporciona un proceso de fermentación de dos fases para la producción de un isoprenoide que comprende las etapas de:

- a) añadir un solvente orgánico inmiscible en agua a un medio acuoso para cultivar células para formar un sistema de dos fases, donde se optimiza la relación del solvente orgánico inmiscible en agua con respecto al medio acuoso y el volumen total de solvente y medio es al menos 10 l;
- b) proporcionar al sistema de dos fases una sonda de oxígeno; después
- c) realizar una calibración de dicha sonda de oxígeno; a continuación
- d) optimizar la tensión de oxígeno en dicho sistema de dos fases, en donde la tensión de oxígeno optimizada está entre 50 – 100 %; después
- 55 e) inocular dicho sistema de dos fases con un microorganismo capaz de producir dicho isoprenoide en dicho sistema de dos fases optimizado en oxígeno en una cantidad suficiente para alcanzar una concentración saturada del mismo en la fase acuosa; a continuación
- f) medir y optimizar la tensión de oxígeno; y
- 60 g) permitir que dicho microorganismo produzca dicho compuesto orgánico a una tensión de oxígeno optimizada entre 0 - 50 %.

En la presente descripción, el término "inmiscible en agua" se refiere a la naturaleza de un solvente orgánico o mezcla de solventes orgánicos que es incapaz o sustancialmente incapaz de mezclarse con el medio de fermentación acuoso. Para el propósito de esta invención, inmiscible en agua se refiere a solventes en los que una proporción significativa del solvente no forma una solución en agua. Un solvente inmiscible en agua adecuado se caracteriza por un valor de logP alto (Schewe y otros, Appl Microbiol Biotechnol (2009) 83:849-857). El solvente

inmiscible en agua tiene, preferentemente, un valor de  $\log P > 3$ , preferentemente, un valor de  $\log P > 4$ , con mayor preferencia, un valor de  $\log P > 4,5$ , con la máxima preferencia, un valor de  $\log P > 5$ .

5 Para el propósito de la invención, el término "medio de fermentación bifásico" o "medio de fermentación de dos fases" pretende incluir un medio de dos fases que comprende un medio de fermentación donde el medio acuoso forma una fase acuosa y una cantidad adecuada de solvente orgánico inmiscible en agua forma una fase orgánica.

10 En una modalidad particular, la calibración del electrodo de oxígeno disuelto referida en el punto c) se lleva a cabo de la siguiente manera: en una primera etapa, se realiza una medición de corriente cero mediante el uso de gel para calibración de punto cero o gases de calibración nitrógeno ( $N_2$ ) o dióxido de carbono ( $CO_2$ ), alternativamente, en un medio de muestra saturado con uno de estos gases. A continuación, la sonda se monta en el fermentador y se esteriliza en autoclave, se añade dodecano y se determina el valor del 100 % (segunda etapa de calibración) después de saturar con aire. En esta modalidad particular, por lo tanto, la sonda de oxígeno se proporciona al fermentador antes de la adición del solvente. Después de la adición del solvente y la saturación del sistema de dos fases con aire, se realiza la calibración al 100 % de oxígeno disuelto.

20 En otra modalidad particular, se realiza una calibración en dos puntos en el sistema de dos fases. Se realiza una primera etapa de calibración en el sistema de dos fases que está agotado de oxígeno (calibración al 0 % de oxígeno disuelto). Después de la saturación del sistema de dos fases con aire, se realiza la segunda etapa de calibración al 100 % de oxígeno disuelto.

25 El término "fase acuosa" se refiere típicamente a la fase de un sistema bifásico que comprende el medio de fermentación acuoso que se forma al entrar en contacto con la fase orgánica. Un sistema se considera acuoso si el agua es el único solvente o el solvente predominante ( $> 50$  % en peso, preferentemente,  $> 80$  % en peso, con mayor preferencia,  $> 90$  % en peso, basado en el total de líquidos), en donde, por ejemplo, una cantidad menor de alcohol u otro solvente ( $< 50$  % en peso, preferentemente,  $< 20$  % en peso, con mayor preferencia,  $< 10$  % en peso, basado en el total de líquidos) puede disolverse (por ejemplo, como una fuente de carbono, en el caso de un enfoque fermentativo completo) en una concentración tal que los microorganismos presentes permanecen activos.

30 El término "fase orgánica" se refiere típicamente a la fase de una mezcla bifásica que comprende el solvente orgánico inmiscible en agua que se forma al entrar en contacto con un medio de fermentación acuoso. El solvente orgánico inmiscible en agua puede ser cualquier solvente. Los solventes orgánicos inmiscibles en agua preferidos se seleccionan del grupo de dodecano, ácido láurico, ácido oleico, n-decano, estearato de butilo, aceite de oliva, aceite de maíz, ftalato de diisononilo (DINP) o cualquier combinación de los mismos. Se prefiere particularmente estos solventes, ya que son sustancialmente no tóxicos para la mayoría de los microorganismos empleados industrialmente en las condiciones del proceso, tienden a no formar emulsiones estables, tienen buenos coeficientes de reparto para los productos de fermentación comunes y pueden separarse de estos compuestos de forma relativamente económica. Por tanto, poseen todas las características imprescindibles para hacer viable la fermentación a escala industrial. En una modalidad preferida particular, el solvente orgánico inmiscible en agua es dodecano.

45 En principio, la producción del isoprenoide puede llevarse a cabo de una manera basada en una metodología conocida per se, por ejemplo, como se describe en la técnica anterior mencionada anteriormente en la presente descripción. La célula huésped puede usarse en una producción fermentativa del isoprenoide, o puede usarse para producir una monoterpene sintasa o una sesquiterpene sintasa, que posteriormente puede usarse para la síntesis del terpenoide deseado.

50 Ventajosamente, el isoprenoide se produce en un proceso fermentativo, es decir, en un método que comprende cultivar una célula huésped en un medio de cultivo en condiciones en donde se expresa típicamente una monoterpene sintasa o una sesquiterpene sintasa. La reacción real catalizada por la monoterpene sintasa o la sesquiterpene sintasa tiene lugar típicamente de forma intracelular.

55 Debe señalarse que el término "fermentativo" se usa en la presente descripción en un sentido amplio para procesos en donde se hace uso de un cultivo de un organismo para sintetizar un compuesto a partir de una materia prima adecuada (por ejemplo, un carbohidrato, una fuente de aminoácidos, una fuente de ácidos grasos). Por lo tanto, los procesos fermentativos como se entienden en la presente descripción no se limitan a condiciones anaeróbicas, y se extienden a procesos en condiciones aeróbicas. Generalmente se conocen materias primas adecuadas para las células huésped. Las condiciones adecuadas pueden encontrarse fácilmente mediante el uso de experimentación de rutina, mediante el uso del conocimiento general, la presente solicitud de patente y, opcionalmente, otra metodología conocida como, por ejemplo, para las células huésped *Rhodobacter* descritas en el documento WO 2011/074954 (en particular, la página 68, ejemplos, parte general, procedimiento de matraz de agitación).

65 En principio, el pH del medio de reacción (medio de cultivo) usado en un método de acuerdo con la invención puede elegirse dentro de amplios límites, siempre que sea compatible con la célula huésped y la isoprenoide sintasa (en la célula huésped) esté activa y muestre una especificidad deseada en las condiciones de pH. El pH se selecciona, preferentemente, de manera que las células sean capaces de realizar su función o funciones pretendidas. El pH

puede elegirse en particular dentro del intervalo de cuatro unidades de pH por debajo del pH neutro y dos unidades de pH por encima del pH neutro, es decir, entre pH 3 y pH 9 en el caso de un sistema esencialmente acuoso a 25 °C. Se han obtenido buenos resultados, por ejemplo, en un medio de reacción acuoso que tiene un pH en el intervalo de 6,8 a 7,5.

En particular, en el caso de que se use una levadura y/o un hongo, pueden preferirse condiciones ácidas, en particular, el pH puede estar en el intervalo de pH 3 a pH 8, basado en un sistema esencialmente acuoso a 25 °C. Si se desea, el pH puede ajustarse mediante el uso de un ácido y/o una base o tamponarse con una combinación adecuada de un ácido y una base.

Los microorganismos necesitan con frecuencia altos niveles de oxígeno para un crecimiento aeróbico eficaz. Por otro lado, la exposición a altos niveles de oxígeno puede presentar estrés oxidativo sobre los microorganismos, lo que conduce a una baja productividad y crecimiento. Por lo tanto, es necesario con frecuencia controlar cuidadosamente el nivel de oxígeno disuelto en el caldo de fermentación. Para *Rhodobacter spaeroides*, por ejemplo, una cepa que puede usarse para la producción de isoprenoides es ventajoso usar altos niveles de saturación de oxígeno en una fase temprana de un proceso de fermentación para generar biomasa y baja saturación de oxígeno en etapas posteriores para promover la producción del isoprenoide. Por lo tanto, la tensión de oxígeno en el caldo debe mantenerse a distintos niveles en todo momento, típicamente entre el 10 % y 100 % de saturación, preferentemente, 20 %-60 % en la fase temprana de fermentación y 0 % y 50 %, preferentemente, 0 % a 25 %, en la fase posterior de la fermentación.

En una modalidad preferida, por lo tanto, la tensión de oxígeno (oxígeno disuelto (OD)) está entre 50 - 100 %, preferentemente, entre 80 - 100 %, con mayor preferencia, aproximadamente 100 % en el momento de la inoculación. Preferentemente, se permite que la tensión de oxígeno disminuya a entre 10 - 60 %, preferentemente, 20 - 50 %, con mayor preferencia, entre 30 - 40 %, con la máxima preferencia, aproximadamente 35 % poco después de la inoculación, y se mantiene a este nivel durante la producción de biomasa. Durante la producción del compuesto orgánico de interés, la tensión de oxígeno disuelto se mantiene, preferentemente, entre 0 - 50 %, con mayor preferencia, entre 5 - 25 %, con mayor preferencia, entre 10 - 15 %, con la máxima preferencia, aproximadamente 12,5 %.

En un ejemplo práctico, los inventores han demostrado que estas condiciones se logran cuando se realiza un proceso de acuerdo con la invención. Un ejemplo comparable, en donde se añadió dodecano después de la inoculación, muestra que estas condiciones no se logran y que la adición de dodecano después de la inoculación tiene un efecto negativo sobre el proceso de fermentación.

Las condiciones anaeróbicas se definen en la presente descripción como condiciones sin ningún oxígeno o en las que no se consume sustancialmente oxígeno por las células cultivadas, en particular un microorganismo, y generalmente corresponde a un consumo de oxígeno inferior a 5 mmol/l.h, preferentemente, a un consumo de oxígeno inferior a 2,5 mmol/l.h, o con mayor preferencia, inferior a 1 mmol/l.h. Las condiciones aeróbicas son condiciones en las que se disuelve en el medio un nivel suficiente de oxígeno para un crecimiento sin restricciones, capaz de soportar una tasa de consumo de oxígeno de al menos 10 mmol/l.h, con mayor preferencia, superior a 20 mmol/l.h, aún con mayor preferencia, superior a 50 mmol/l.h, y con la máxima preferencia, superior a 100 mmol/l.h.

Las condiciones limitadas en oxígeno se definen como condiciones en las que el consumo de oxígeno está limitado por la transferencia de oxígeno desde el gas al líquido. El límite inferior para condiciones limitadas en oxígeno está determinado por el límite superior para condiciones anaeróbicas, es decir, generalmente al menos 1 mmol/l.h, y en particular al menos 2,5 mmol/l.h, o al menos 5 mmol/l.h. El límite superior para condiciones de oxígeno limitado está determinado por el límite inferior para condiciones aeróbicas, es decir, inferior a 100 mmol/l.h, inferior a 50 mmol/l.h, inferior a 20 mmol/l.h o inferior a 10 mmol/l.h.

Si las condiciones son aeróbicas, anaeróbicas o limitadas en oxígeno depende de las condiciones en las que se lleva a cabo el método, en particular de la cantidad y composición del flujo de gas entrante, las propiedades reales de mezcla/transferencia de masa del equipo usado, el tipo de microorganismo usado y la densidad de microorganismo.

En principio, la temperatura usada no es fundamental, siempre que la isoprenoide sintasa (en las células) muestre una actividad sustancial. Generalmente, la temperatura es al menos 0 °C, en particular, al menos 15 °C, más en particular, al menos 20 °C. Una temperatura máxima deseada depende de la isoprenoide sintasa y de la célula huésped usada. En dependencia de las células y/o de la isoprenoide sintasa usada, la temperatura es 70 °C o menos, preferentemente, 50 °C o menos, con mayor preferencia, 40 °C o menos, en particular, 37 °C o menos. Organismos como *Thermus thermophilus* tienen una temperatura óptima para el crecimiento entre 49 °C y 72 °C, *Escherichia coli* aproximadamente 37 °C, y muchos microorganismos fúngicos como levaduras y microorganismos bacterianos como *Rhodobacter spaeroides* tienen temperaturas óptimas de alrededor de 30 °C. En el caso de un proceso fermentativo, las condiciones de incubación pueden elegirse dentro de amplios límites siempre que las células muestren suficiente actividad y/o crecimiento. Esto incluye intervalos de pH, intervalos de temperatura y condiciones aeróbicas, limitadas en oxígeno y/o anaeróbicas.

En una modalidad de la invención, el solvente orgánico inmiscible en agua se introduce en el medio acuoso en una cantidad eficaz para facilitar la extracción in situ del compuesto orgánico producido en la fase orgánica y para aumentar la velocidad y/o rendimiento de su producción por el microorganismo en la fase acuosa. De acuerdo con una modalidad preferida de la invención, la relación de solvente orgánico inmiscible en agua con respecto al medio acuoso está entre 0,5 % (v/v) y 60 % (v/v), preferentemente, entre 2 % (v/v) y 40 % (v/v) y con mayor preferencia, entre 5 % (v/v) y 20 % (v/v).

Un solvente que se utilizará como extractante en un proceso de acuerdo con la invención cumple, preferentemente, los siguientes requisitos para su uso en un proceso comercial de fermentación extractiva de dos fases: baja solubilidad en agua, no tóxico para el microorganismo productor, coeficiente de reparto grande para el producto, bajo coeficiente de reparto para los nutrientes, alta selectividad, baja tendencia a la formación de emulsiones, alta estabilidad química y térmica, no biodegradabilidad, no peligroso y/o de bajo costo.

Adecuada en particular (para la extracción a partir de un medio de reacción acuoso) es la extracción con un solvente orgánico líquido, tal como un hidrocarburo líquido. A partir de los resultados iniciales, es evidente que este método también es adecuado para extraer el isoprenoide (u otro producto) a partir de un medio de reacción que comprende células de acuerdo con la invención usadas para su producción, sin necesidad de lisar las células para la recuperación del isoprenoide (u otro producto). En particular, el solvente orgánico puede seleccionarse de alcanos líquidos, alcoholes líquidos de cadena larga (alcoholes que tienen al menos 12 átomos de carbono) y ésteres líquidos de ácidos grasos de cadena larga (ácidos que tienen al menos 12 átomos de carbono). Los alcanos líquidos adecuados incluyen, en particular, alcanos C6-C16, tales como hexano, octano, decano, dodecano, isododecano y hexadecano. El alcohol alifático de cadena larga adecuado, en particular, incluye alcoholes alifáticos C12-C18, como alcohol oleílico y alcohol palmitoleílico. Los ésteres adecuados de ácidos grasos de cadena larga incluyen, en particular ésteres de alcoholes C1-C4 o ácidos grasos C12-C18, como miristato de isopropilo y oleato de etilo

En una modalidad ventajosa, el isoprenoide (u otro producto) se produce en un reactor que comprende una primera fase líquida (la fase de reacción), donde dicha primera fase líquida contiene células de acuerdo con la invención, en donde se produce el isoprenoide (u otro producto) y una segunda fase líquida (fase orgánica que permanece esencialmente separada en fases de la primera fase cuando entra en contacto), donde dicha segunda fase líquida es la fase de extracción, por la que el producto formado tiene una mayor afinidad. Este método es ventajoso porque permite la recuperación del producto in situ. Además, contribuye a prevenir o al menos reducir los efectos tóxicos potenciales del isoprenoide (u otro producto) en las células, porque debido a la presencia de la segunda fase, la concentración de isoprenoide (u otro producto) en la fase de reacción puede mantenerse relativamente baja durante todo el proceso. Finalmente, la fase de extracción contribuye a extraer el isoprenoide (u otro producto) fuera de la fase de reacción.

En un método preferido de la invención, la fase de extracción forma una capa encima de la fase de reacción o se mezcla con la fase de reacción para formar una dispersión de la fase de reacción en la fase de extracción o una dispersión de la fase de extracción en la fase de reacción. Por lo tanto, la fase de extracción no solo extrae el producto de la fase de reacción, sino que también ayuda a reducir o evitar por completo las pérdidas del producto formado a partir del reactor a través del gas de escape, que puede producirse si el isoprenoide se produce en la fase de reacción (acuosa) o se excreta hacia la fase de reacción (acuosa). El isoprenoide es poco soluble en agua y, por lo tanto, se volatiliza fácilmente del agua. Se contempla que se evita al menos sustancialmente que el isoprenoide solvatado en la fase orgánica (como una capa o dispersión) se volatilice.

Los líquidos adecuados para su uso como fase de extracción combinan una densidad más baja que la fase de reacción con una buena biocompatibilidad (sin interferencia con la viabilidad de las células vivas), baja volatilidad y casi una inmiscibilidad absoluta con la fase de reacción acuosa. Ejemplos de líquidos adecuados para esta aplicación son alcanos líquidos como decano, dodecano, isododecano, tetradecano y hexadecano o alcoholes alifáticos de cadena larga como alcohol oleílico y alcohol palmitoleílico, o ésteres de ácidos grasos de cadena larga como miristato de isopropilo y oleato de etilo (ver, por ejemplo, Asadollahi y otros (Biotechnol. Bioeng. (2008) 99: 666-677), Newman y otros (Biotechnol. Bioeng. (2006) 95: 684-691) y documento WO 2009/042070). En una modalidad preferida, se proporciona un proceso de acuerdo con la invención, en donde el solvente orgánico inmiscible en agua es un alcano líquido o un alcohol alifático de cadena larga o un éster de un ácido graso de cadena larga o un isoprenoide. En una modalidad preferida, el solvente orgánico es dodecano, ácido láurico, ácido oleico, n-decano, estearato de butilo, aceite de oliva, aceite de maíz o DINP, con la máxima preferencia, dodecano.

En un proceso de la invención, el solvente orgánico inmiscible en agua se añade antes del inicio de la fermentación, es decir, antes de inocular el sistema de dos fases con un microorganismo capaz de producir el compuesto orgánico. Es una ventaja añadir el solvente antes del inicio de la fermentación, ya que la introducción del solvente durante la fermentación conlleva el riesgo de introducir contaminantes en el medio que podrían ser perjudiciales para el resultado del proceso de fermentación. Adicionalmente, el oxígeno tiene una mayor solubilidad en solventes orgánicos, lo que complica la precisión de la medición si los solventes se añaden posteriormente. Por lo tanto, la adición de solventes orgánicos durante la fermentación tiene un impacto crucial en la medición precisa de parámetros operativos tales como el pH y el oxígeno disuelto necesarios para controlar la fermentación. Una ventaja

adicional es que el momento de la introducción del solvente en un método convencional viene dictado por el proceso de fermentación.

5 Si se desea, los isoprenoides producidos en un método de acuerdo con la invención, u otro compuesto en el que se ha convertido el isoprenoide después de su preparación (tal como nootkatona), se recuperan a partir del medio de reacción, en donde se preparó. Un método adecuado es la extracción líquido-líquido con un líquido de extracción que no sea miscible con el medio de reacción.

10 Una estrategia particular para realizar la fermentación es añadir el solvente orgánico antes del inicio de la fermentación, lo que permite la esterilización in situ del medio y el solvente en ausencia del microorganismo productor. La esterilización simultánea de las dos fases evita además la necesidad de múltiples etapas de esterilización de las fases individuales. Además, la calibración de sondas cruciales, tales como la sonda de oxígeno, debe realizarse en presencia del solvente orgánico. Por lo tanto, la sonda de oxígeno debe ser adecuada para medir la tensión de oxígeno en el sistema de dos fases, por lo tanto, en presencia del solvente orgánico. Al añadir el solvente de antemano y optimizar la tensión de oxígeno en el sistema de dos fases, se evitan las desventajas asociadas con la adición intermedia del solvente durante la fermentación. En una modalidad preferida, la invención proporciona un proceso de acuerdo con la invención, en donde el proceso comprende además esterilizar el sistema de dos fases preparado en la etapa a), preferentemente, al esterilizar el sistema de dos fases al menos a 1 bar de sobrepresión durante al menos 20 minutos al menos a 120 °C, preferentemente, 20 - 40 minutos a aproximadamente 121 °C al menos a 1 bar de sobrepresión. Preferentemente, la etapa de esterilización tiene lugar antes de la etapa e), con mayor preferencia, antes de la etapa c). En una modalidad particular, en lugar de esterilizar el sistema de dos fases, se usa medio estéril como la fase acuosa, esterilizado típicamente antes o después de añadir el medio al biorreactor, y se le añade solvente estéril. Es posible añadir solvente estéril, por ejemplo, al pasar el solvente a través de un filtro de esterilización (por ejemplo, un filtro de 0,22 µm) o mediante el uso de solvente esterilizado previamente. Se conocen en la técnica métodos para añadir un solvente a una fase acuosa, de manera que el sistema de dos fases resultante permanezca estéril.

30 Para el propósito de la invención, los términos "medio de fermentación" y "medio" pretenden incluir el medio líquido en el que se cultivan los microorganismos. En una modalidad particular, se prefiere usar un medio semisólido. Un medio de fermentación típico incluye comúnmente un sustrato y nutrientes. El medio de fermentación contiene adicionalmente el microorganismo, el producto producido por el microorganismo, intermediarios metabólicos y otros componentes tales como sales, vitaminas, aminoácidos, cofactores y antibióticos. Los sustratos son comúnmente azúcares o carbohidratos más complejos que se metabolizan por el microorganismo para obtener energía y componentes estructurales básicos, pero también pueden ser lípidos y/o proteínas.

35 El proceso de fermentación de dos fases de la presente invención es particularmente adecuado para la producción a escala industrial de un isoprenoide. En consecuencia, en una modalidad preferida de la invención, el volumen total del solvente y el medio es al menos 30 l, preferentemente, al menos 100 l, con mayor preferencia, al menos 1000 l, con mayor preferencia, al menos 10 000 l, con la máxima preferencia, al menos 30 000 l o más.

40 En la presente descripción, el término "isoprenoide" se refiere a una clase grande y diversa de compuestos orgánicos de origen natural compuestos típicamente por dos o más unidades de hidrocarburos, donde cada unidad consiste en cinco átomos de carbono dispuestos en un patrón específico. Los isoprenoides se construyen a partir de unidades de isopreno (2-metil-1,3-butadieno) y el precursor biológico de todos los isoprenoides naturales es el difosfato de isopentenilo (IPP). El isopreno (2-metil-1,3 butadieno) es un hidrocarburo no saturado de cadena ramificada. Ejemplos no limitantes de isoprenoides adecuados incluyen hemiterpenos (derivados a partir de una sola unidad de isopreno) tales como isopreno, monoterpenos (derivados a partir de dos unidades de isopreno) tales como micreno, sesquiterpenos (derivados a partir de tres unidades de isopreno) tales como amorfa-4,11-dieno, diterpenos (derivados a partir de cuatro unidades de isopreno) tales como taxadieno, triterpenos (derivados a partir de seis unidades de isopreno) tales como escualeno, tetraterpenos (derivados a partir de ocho unidades de isopreno) tales como 3-caroteno y politerpenos (derivados a partir de más de ocho unidades de isopreno) tales como poliisopreno o mezclas de estos. Los terpenoides también se incluyen como terpenos para los propósitos de la presente invención. En una modalidad preferida particular, el isoprenoide es un monoterpeno o sesquiterpeno, diterpeno o triterpeno, con mayor preferencia, un monoterpeno o iridoide seleccionado del grupo que consiste en ascaridol, bornano, borneol, canfeno, alcanfor, cantaridina, careno, carvacrol, carveol, carvona, ácido carvónico, ácido crisantémico, crisantenona, citral, citronelal, citronelol, cuminaldehído, p-cimeno, cimenos, epomediol, eucaliptol, fenchol, fenchona, ácido geránico, geraniol, acetato de geraniol, mercaptano de toronja, halomno, hinokitiol, (S)-ipsdienol, levoverbenona, limoneno, linalool, acetato de linalilo, lineatina, p-mentano-3,8-diol, mentofurano, mentol, mentona, mentoxipropanodiol, acetato de mentilo, 2-metilisborneol, mirceno, mircenol, nerol, ocimeno, perilla cetona, perilla aldehído, perillartina, felandreno, picrocrocina, pineno, alfa-pineno, beta-pineno, piperitona, pulegona, rodinol, óxido de rosa, sabineno, safranal, sobrerol, terpinen-4-ol, terpineno, terpineol, tuyaplicina, tuyeno, tuyona, timol, timoquinona, umbelulona y verbenona, y/o un sesquiterpeno o una lactona sesquiterpénica seleccionada del grupo que consiste en ácido abscísico, amorfa-4,11-dieno, andrografólido, aristoloqueno, arteméter, artemitol, artesunato, bisaboleno, bisabolol, botridial, cadaleno, cadineno, alfa-cadinol, delta-cadinol, capneleno, capsidiol, carotol, cariofileno, cedreno, cedrol, copaeno, cubebol, elemeno, farneseno, farnesol, furanolactona, germacreno, guaiazuleno, guaieno, guaiol, girinal, hernandulcina,

humuleno, iludina, indometacina farnesil, isocomeno, juvabiona, longifoleno, mutisiantol, nerolidol, nootkatona, norpatchoulol, onquidal, patchulol, periplanona b, petasina, ácido faseico, poligodial, A-Santalol, B-Santalol, ácido santónico, selineno, ácido esterpúrico, tuyopseno, valenceno, velleral, verrucarina A, vetivazuleno, A-vetivona y zingibereno, y/o

5 un diterpeno, una pleuromutilina o un taxano seleccionado del grupo que consiste en abietano, ácido abiético, agelasina, afidicolina, beta-araneoseno, bipinatina j, cafestol, ácido carnósico, cembreno a, 10-desacetilbacatina, ferruginol, fichtelita, forskolina, galanolactona, geranilgeraniol, giberelina, ginkgólido, grayanotoxina, guanacastepeno a, mebutato de ingenol, ácido corosólico, ácido isopimárico, kahweol, labdano, lagoquilina, leelamina, ácido levopimárico, menatetrenona, momilactona b, 18-norabietano, panicudina, forbol, 12,13-dibutirato de forbol, fitano, 10 ácido fitánico, fitol, ácido pimárico, pristano, ácido pristánico, prostratina, pseudopterosina a, cuasina, retinol, esclareno, esclareol, simonellita, estemareno, estemodeno, esteviol, glucósido de esteviol, taxodona, 12-O-tetradecanoil-13-acetato, tetrahidrocannabinol-C4, ácido tetrahidrocannabinólico, totarol y triptólido, y/o

15 un triterpeno seleccionado del grupo que consiste en absintina, acetoxolona, aescina, ambreína, amirina, balsaminapentaol, balsaminol a, balsaminol b, betulina, ácido betulínico, bevirimat, ácido boswélico, brioamárido, carbenoxolona, celastrol, ácido corosólico, cucurbalsaminol A, cucurbalsaminol B, cucurbitano, cicloartenol, cicloastragenol, dammarano, endecafillacina, ácido ganodérico, ginsenósido, ácido glicirretínico, glicirricina, hederagenina, hemslecina, hopano, hopanoides, karavilagenina e, lanostano, lanosterol, lepidólido, lupeol, malabacarina, ácido maslínico, momordicina I, momordicina-28, momordicinina, ácido morónico, neokuguagluósido, oleanano, ácido oleanólico, 2,3-oxidoescualeno, panaxatriol, perseapicrósido, protopanaxadiol, protopanaxatriol, 20 saponina, escualano, escualeno, tetranortriterpenoide, saponina triterpenoide, ácido ursólico y yamogenina.

De acuerdo con una modalidad preferida de la invención, dicho microorganismo, cuando se cultiva en dicha fase acuosa, es capaz de producir dicho isoprenoide en una cantidad suficiente para alcanzar una concentración saturada del mismo en dicha fase acuosa.

25 Los presentes procesos de fermentación son útiles con casi cualquier tipo de microorganismo usado para la fermentación. El microorganismo podría ser cualquier microorganismo que sea capaz de producir un compuesto orgánico, preferentemente, un isoprenoide. A modo de ejemplo, el microorganismo puede ser una levadura, bacterias, hongos o una mezcla de cualquiera de estos. En una modalidad preferida particular, el microorganismo se optimiza para la producción de dicho compuesto orgánico, por ejemplo, mediante modificaciones genéticas.

En una modalidad preferida particular, el microorganismo es una bacteria o un hongo o una célula vegetal. En una modalidad preferida, el microorganismo es una célula bacteriana seleccionada del grupo de bacterias Gram negativas, tales como *Rhodobacter*, *Agrobacterium*, *Paracoccus* o *Escherichia*;

35 una célula bacteriana seleccionada del grupo de bacterias Gram positivas, tales como *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Brevibacterium*;

una célula fúngica seleccionada del grupo de *Aspergillus*, *Blakeslea*, *Penicillium*, *Phaffia* (*Xanthophyllomyces*), *Pichia*, *Saccharomyces*, *Yarrowia* y *Hansenula*;

40 una planta transgénica o cultivo que comprende células vegetales transgénicas, en donde el microorganismo es de una planta transgénica seleccionada de *Nicotiana spp.*, *Cichorium intybus*, *Lacuca sativa*, *Mentha spp.*, *Artemisia annua*, plantas formadoras de tubérculos, cultivos y árboles oleaginosos; o

un hongo transgénico o cultivo que comprende células de hongo transgénico, en donde el microorganismo se selecciona de *Schizophyllum*, *Agaricus* y *Pleurotisi*. En una modalidad más preferida, el microorganismo es una bacteria *Rhodobacter sphaeroides*.

45 En una modalidad, se proporciona un proceso de acuerdo con la invención, en donde el proceso comprende además el aislamiento del compuesto orgánico a partir del sistema de dos fases. Dado que el compuesto orgánico se acumula, preferentemente, en el solvente orgánico inmiscible en agua, el compuesto orgánico se aísla, preferentemente, a partir de dicho solvente orgánico. Los métodos de extracción de compuestos orgánicos se conocen por los expertos e incluyen, pero no se limitan a, extracciones líquido-líquido, destilación, pervaporación, etc. En una modalidad preferida, el compuesto orgánico se extrae por pervaporación. La pervaporación es un método técnico de membrana para la separación de mezclas de líquidos por vaporización parcial a través de una membrana no porosa o porosa. Se prefiere que antes de aislar el compuesto orgánico, se permita que el microorganismo produzca dicho compuesto orgánico durante una cantidad de tiempo suficiente, preferentemente, 50 durante al menos 2 días y no más de 7 días.

El proceso puede realizarse en un modo por lotes, en un modo por lote alimentado o en un modo continuo. Los términos "modo por lotes", "modo por lote alimentado" y "modo continuo" se conocen por un experto en la técnica. Un proceso de acuerdo con la invención puede realizarse fácilmente de manera que se ejecute en un modo por lotes, modo por lote alimentado o modo continuo.

Los siguientes ejemplos describen modalidades específicas de la presente invención y no pretenden limitar la invención de ninguna manera.

65 Leyenda de las figuras

Figura 1: Perfil de oxígeno durante la fermentación de valenceno en un fermentador de 40 l mediante la adición de n-dodecano antes de la inoculación. Antes de la adición del cultivo de siembra, el electrodo de oxígeno se calibró cuidadosamente al 0 % y al 100 % de saturación de oxígeno. Después de la inoculación, se dejó que el oxígeno disuelto (OD) disminuyera hasta el 35 % y se mantuvo constante a partir de entonces. A las 70 h, el OD se ajustó al 12,5 % y se mantuvo constante hasta el final de la fermentación.

Figura 2: Perfil de oxígeno durante la fermentación de valenceno en un fermentador de 40 L mediante la adición de n-dodecano después de la inoculación. Antes de la adición del cultivo de siembra, el electrodo de oxígeno se calibró cuidadosamente al 0 % y al 100 % de saturación de oxígeno. Después de la inoculación, se dejó que el oxígeno disuelto (OD) disminuyera hasta el 35 % y se mantuvo constante a partir de entonces. A las 10 h después de la inoculación se añadió lentamente el n-dodecano, lo que provocó un rápido aumento del oxígeno disuelto.

## Ejemplos

Ejemplo 1: Medio de siembra

Tabla 1

Ingrediente	g/l
Extracto de levadura	20,8
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	10,3
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,086
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,029
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	1,08
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,96
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,44
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,44

El pH se ajusta a 7,0 con NaOH 5N

Los componentes (excepto la glucosa) se disuelven en agua, se ajustan a pH 7 y se esterilizan en autoclave.

Ejemplo 2: Medio de fermentación principal:

Tabla 2

Ingrediente	g/l
Extracto de levadura	25
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1,5
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,1
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,03
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	1,1
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,15
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> Fe(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	1,2
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,4
(NH <sub>4</sub> )H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	1,7

Ejemplo 3: Calibración en dos puntos del electrodo de oxígeno

El medio de fermentación se prepara de acuerdo con la receta (Tabla 2) y se esteriliza en autoclave dentro del fermentador. Se añade una solución de glucosa estéril hasta una concentración final de 30 g/l y se añade neomicina (100 mg/ml). A continuación, se añade 20 % en volumen de n-dodecano estéril. El agitador se agita a la velocidad

máxima aplicada durante la ejecución de la fermentación y el flujo de aire se ajusta al menos a 1 vvm (volumen/volumen por minuto). La sobrepresión se mantiene tan baja y constante como sea posible durante la fermentación. El pH y la temperatura se establecen a valores de fermentación. El gas nitrógeno se burbujea en el fermentador a 1 vvm hasta que el reactor se agota completamente de oxígeno. Cuando el valor leído en el electrodo es estable, ese valor del electrodo se fija como 0 %.

Alternativamente, para fermentadores grandes con volumen > 100 l, la calibración al 0 % de oxígeno se realiza fuera del fermentador principal en un recipiente pequeño y después el electrodo calibrado se transfiere al fermentador principal.

A continuación, el fermentador principal se burbujea con aire al flujo de gas máximo aplicado durante la ejecución de la fermentación. Cuando el valor leído en el electrodo es estable, ese valor del electrodo se fija como 100 %. Otros parámetros de fermentación (presión, flujo de aire, rpm) se establecen en el punto de inicio de la fermentación y el fermentador se inocula con un precultivo de *Rhodobacter sphaeroides* con una densidad celular correspondiente a aprox. 40 unidades a DO620nm con una relación de inoculación del 5 %.

Ejemplo 4: Ejemplo comparativo de adición de n-dodecano durante la fermentación

La fermentación principal se realizó en un recipiente de 35 m<sup>3</sup> que se carga con 10 000 kg de medio que contiene 22 g/l de glucosa inicial a una temperatura de 30 °C, un pH de 7,0 (controlado con una solución de NH<sub>3</sub> al 28 % en peso), una aireación de 2 Nm<sup>3</sup>/min y una sobrepresión de 0,5 bar. A las 0 horas se inoculó la fermentación principal mediante el uso de 1 m<sup>3</sup> de cultivo de siembra (ver ejemplo 7). El oxígeno disuelto (OD) se mantiene constante al 35 % mediante el ajuste de la velocidad del agitador entre 60 y 90 RPM y el ajuste de la aireación entre 0,2 y 1,8 vvm. Después de 12 horas de fermentación por lotes, el valor de pO<sub>2</sub> disminuyó drásticamente hasta un valor del 15 % y comenzó a aumentar rápidamente después de eso. Además, el pH aumenta rápidamente de pH 7,0 a pH 7,7. El análisis muestra que se consumió toda la glucosa y se inició la alimentación con glucosa, y se mantiene el pH a 7,0. Después de 26 horas, se añadieron lentamente 2000 l de n-dodecano al fermentador a través de un filtro estéril, con una tasa de dosificación de 500 l/hora. Durante la adición de n-dodecano se observó que la señal de pO<sub>2</sub> era muy inestable y difícil de controlar. Finalmente, después de que se añadió todo el n-dodecano, el valor de pO<sub>2</sub> había aumentado del 35 % a aproximadamente el 80 %. Las comprobaciones regulares de la glucosa residual demostraron que el proceso avanzaba en limitación por glucosa. Después de aproximadamente 60 horas, la tasa de respiración comenzó a disminuir y comenzó a producirse la acumulación de glucosa. Después de 78 horas, la glucosa dejó de consumirse y la concentración aumentó rápidamente. El análisis de la concentración de valenceno indicó que la biomasa ya no estaba activa.

Ejemplo 5: Fermentación de valenceno en un fermentador de 40 l con adición de n-dodecano antes de la inoculación

Se cultivó un vial de reserva congelado que contenía 1 ml de una cepa productora de valenceno de *Rhodobacter sphaeroides* que contenía genes que codifican la ruta del mevalonato de *Paracoccus denitrificans* y un gen de la valenceno sintasa (ver Ejemplo 9) en un matraz de agitación de 2000 ml que contenía 500 ml de medio como se describe en el ejemplo 1 y 100 mg/l adicionales de neomicina. El matraz de agitación se incubó en un agitador orbital a 180 rpm y una amplitud de 4 cm durante 46 horas a 30 °C. El cultivo se transfirió a un fermentador Techfors-S de acero inoxidable de 40 l de Infors que contenía 9 kg de medio con la siguiente composición: extracto de levadura 21 g/l, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1,73 g/l, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,104 g/l, MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 0,035 g/l, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 1,3 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,73 g/l, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,73 g/l, dextrosa 33 g/l, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>Fe(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 1,2 g/l, FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 0,17 g/l, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2,76 g/l, (NH<sub>4</sub>)H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,94 g/l, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 1,6 g/l y n-dodecano 125 g/l. Antes de la adición del cultivo de siembra, el medio se esterilizó, se ajustó a pH 7 con NH<sub>4</sub>OH al 25 % en peso y el electrodo de oxígeno se calibró cuidadosamente al 0 % y al 100 % de saturación de oxígeno, de acuerdo con el procedimiento descrito en el ejemplo 2. Después de la inoculación, la fermentación se ejecuta en modo por lotes a 30 °C y un pH de 7,0 durante 16,5 horas, y se permite que el OD disminuya inicialmente hasta el 35 % y se mantiene constante a partir de entonces. Después de esta fase por lotes, se inicia la alimentación de glucosa mediante la adición de 17,2 kg de una solución que contiene 55 % en peso de glucosa. Durante esta fase, el pH se mantuvo constante a 7,0 y el OD al 35 %. A las 70 horas, el punto de ajuste de pO<sub>2</sub> se estableció en 12,5 % y se mantuvo constante hasta el final de la fermentación mediante el ajuste de la velocidad del agitador. Se registró el perfil de oxígeno durante la fermentación y se presenta en la Figura 1.

Ejemplo 6: Ejemplo comparativo de fermentación de valenceno en un fermentador de 40 l

Se repitió el experimento descrito en el ejemplo 5, excepto que el medio de la fermentación principal no contenía n-dodecano. Después de la preparación, esterilización y enfriamiento del medio, el electrodo de oxígeno se calibró cuidadosamente al 0 % y al 100 % de saturación de oxígeno. A continuación, se inoculó el fermentador mediante la adición de 500 ml de un cultivo de siembra preparado de acuerdo con el procedimiento descrito en el ejemplo 4 y se ejecutó en modo por lotes a 30 °C y pH 7,0 durante aproximadamente 10 horas, y se permitió que el OD disminuyera hasta el 35 %. A las 10 horas después de la inoculación se inició la alimentación de glucosa, seguida de la adición lenta de 1500 ml de n-dodecano a través de un filtro estéril, con una tasa de dosificación de 400 ml/hora. Después de añadir el n-dodecano, el OD aumentó rápidamente como se muestra en la Figura 2. El análisis de la glucosa

residual mostró que después de aproximadamente 20 horas de fermentación, comenzó a acumularse la glucosa. El análisis de la cantidad de biomasa indicó que el crecimiento celular se había detenido.

#### Ejemplo 7: Cultivo de siembra

5 Se carga un fermentador de 2500 l con 1000 kg de medio de siembra. La composición del medio se muestra en la Tabla 1. Después de esterilización a 121 °C durante 30 minutos, se añade neomicina a través de un filtro estéril hasta una concentración final de 100 mg/kg y 68 kg de glucosa al 55 % en peso. A continuación, se calibra la sonda de oxígeno seguido de la inoculación del fermentador con 500 ml de un cultivo celular. La fermentación se opera en modo por lotes durante 48 horas a 30 °C, pH 7,0 mediante el uso de solución de NH<sub>3</sub> al 25 % en peso, una aireación de 1 vvm, una sobrepresión de 0,3-0,4 bar, y un OD de 35 %. El OD se mantiene constante mediante agitación.

#### Ejemplo 8: Fermentación principal con adición de n-dodecano antes de la inoculación

15 La fermentación principal se realiza en modo de alimentación por lotes mediante el uso de un recipiente de 35 m<sup>3</sup> que se carga con 10 000 kg de medio. La composición del medio se muestra en la Tabla 2. Para preparar 10 000 kg de medio, los componentes del medio se disuelven en agua, se esterilizan en autoclave a 121 °C durante 30 minutos en el biorreactor.

20 Después de esterilizar y enfriar el medio, el pH se ajusta a 7 con NH<sub>4</sub>OH al 25 %. Después de la esterilización, se añaden 600 kg de glucosa al 55 % en peso. A continuación, se añaden 2000 l (1666 kg) de n-dodecano a través de un filtro estéril. Se calibra la sonda de oxígeno (ver el ejemplo 3). La fermentación comienza mediante la adición de 1000 l de cultivo obtenido a partir de una siembra. Después de la inoculación, la fermentación se ejecuta en modo por lotes a 30 °C y pH a 7,0 durante 20 horas, y se mantiene el OD al 35 %. El OD se mantiene constante al 35 % mediante el ajuste de la velocidad del agitador entre 60 y 90 RPM y el ajuste de la aireación entre 0,2 y 1,8 vvm. Después de 20 horas se inicia la alimentación de glucosa, y se mantiene el pH a 7,0 y el OD al 35 %. A las 70 horas, el punto de ajuste de pO<sub>2</sub> se puso en 12,5 % y se mantuvo constante hasta el final de la fermentación mediante el ajuste de la velocidad del agitador. El modo de alimentación por lotes se ejecuta durante aproximadamente 120 horas a 30 °C y pH a 7,0.

30 Las comprobaciones regulares de la glucosa residual demostraron que el proceso avanzaba en limitación por glucosa. La tasa de respiración se mantuvo alta durante todo el transcurso de la fermentación y no se observó acumulación de glucosa. El análisis de la concentración de valenceno mostró que la biomasa todavía producía valenciano 140 horas después de la inoculación.

#### 35 Ejemplo 9: Cepa de *Rhodobacter* productora de valenceno

40 La cepa Rs265-9c de *Rhodobacter sphaeroides* se obtuvo de la cepa ATCC 35053 de *Rhodobacter sphaeroides* [comprada de la American Type Culture Collection (ATCC - Manassas, VA, EE. UU. - [www.atcc.org](http://www.atcc.org)); número 35053; *Rhodobacter sphaeroides* (van Niel) Imhoff y otros, aislada a partir de un estanque de sedimentación de aguas residuales en Indiana y depositada como *Rhodopseudomonas sphaeroides* van Niel] después de dos rondas de mutagénesis y se usó como el huésped base para la construcción de cepas recombinantes que tienen una producción mejorada de isoprenoide. Para obtener detalles sobre esta cepa, ver el documento WO20110749654.

45

## REIVINDICACIONES

1. Un proceso de fermentación de dos fases para la producción de un isoprenoide, que comprende las etapas de:
- 5
- a) añadir un solvente orgánico inmisible en agua a un medio acuoso para cultivar células para formar un sistema de dos fases, en donde la relación de solvente orgánico inmisible en agua con respecto al medio acuoso está entre 0,5 % (v/v) y 60 % (v/v) y el volumen total de solvente y medio es al menos 10 l;
- 10
- b) proporcionar al sistema de dos fases una sonda de oxígeno; después
- c) realizar una calibración de dicha sonda de oxígeno; después
- d) optimizar la tensión de oxígeno en dicho sistema de dos fases, en donde la tensión de oxígeno optimizada está entre 50 - 100 %; después
- 15
- e) inocular dicho sistema de dos fases con un microorganismo capaz de producir dicho isoprenoide en dicho sistema de dos fases optimizado en oxígeno en una cantidad suficiente para alcanzar una concentración saturada del mismo en la fase acuosa; después
- f) medir y optimizar la tensión de oxígeno; y
- g) permitir que dicho microorganismo produzca dicho isoprenoide a una tensión de oxígeno optimizada de entre 0 - 50 %.
- 20
2. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el volumen total de solvente y medio es al menos 30 l.
3. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el proceso comprende además esterilizar el sistema de dos fases preparado en la etapa a), en donde la esterilización tiene lugar antes de la etapa e).
- 25
4. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el proceso comprende además el aislamiento del isoprenoide a partir del sistema de dos fases.
5. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el solvente orgánico inmisible en agua es un alcano líquido o un alcohol alifático de cadena larga o un éster de un ácido graso de cadena larga o un isoprenoide.
- 30
6. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el solvente orgánico inmisible en agua es dodecano, ácido láurico, ácido oleico, n-decano, estearato de butilo, aceite de oliva, aceite de maíz o ftalato de diisononilo (DINP).
- 35
7. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el microorganismo es una célula bacteriana Gram positiva, una célula bacteriana Gram negativa, una célula fúngica, una planta transgénica o cultivo que comprende una célula vegetal transgénica o un hongo transgénico o cultivo que comprende una célula fúngica transgénica.
- 40
8. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el porcentaje de solvente orgánico inmisible en agua en el sistema de dos fases está entre 2 % (v/v) y 40 % (v/v).
- 45
9. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el oxígeno disuelto durante la etapa de producción (f) nunca supera el 80 %.

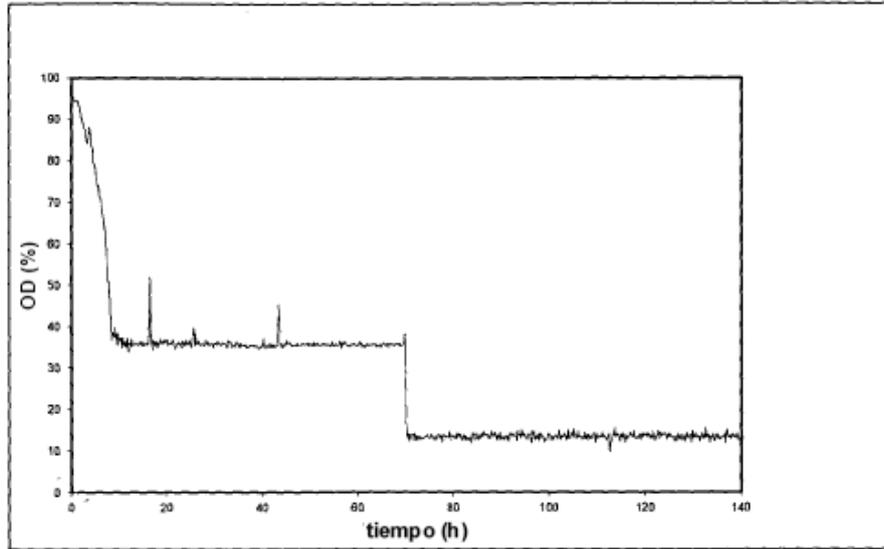


Figura 1

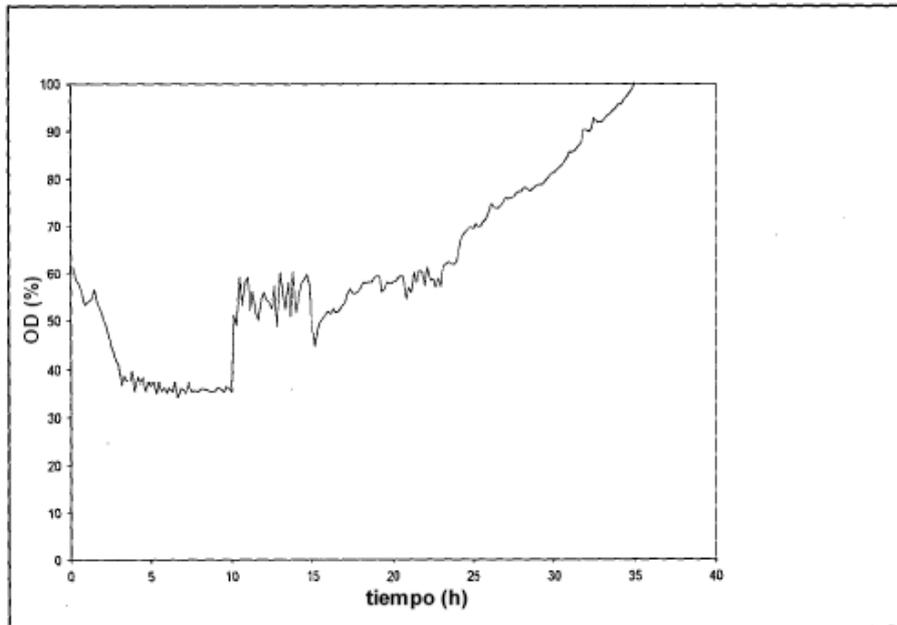


Figura 2