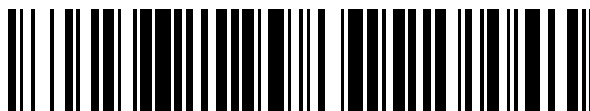


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 384 630**

51 Int. Cl.:

C12P 7/62 (2006.01)

C08G 63/89 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06721599 .6**

96 Fecha de presentación: **06.03.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1853713**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.11.2007**

54 Título: **Procedimiento para el aislamiento de polihidroxialcanoatos (PHA) de células bacterianas mediante extracción en disolvente**

30 Prioridad:
04.03.2005 BR PI0501844

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
10.07.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
10.07.2012

73 Titular/es:
**PHB INDUSTRIAL S.A.
USINA DA PEDRA, S/N, BAIRRO ZONA RURAL
14150-000 SERRANA - SP, BR**

72 Inventor/es:
**MANTELATTO, Paulo Eduardo y
DURÃO, Nazareno Antônio Sertóri**

74 Agente/Representante:
Ungría López, Javier

ES 2 384 630 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para el aislamiento de polihidroxialcanoatos (PHA) de células bacterianas mediante extracción en disolvente.

5

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento para la extracción y recuperación de polihidroxialcanoatos (PHA) de una biomasa celular bacteriana usando disolventes de PHA no halogenados que no son agresivos para el medio ambiente, en el que el procedimiento permite obtener polihidroxialcanoatos (PHA) de pureza elevada y de alto peso molecular.

10

Antecedentes de la invención

Es actualmente sabido en la industria mundial que existe una necesidad de producción de materiales biodegradables y biocompatibles usando materias primas renovables y fuentes de energía a través de procedimiento que no sean agresivos con el medio ambiente.

15

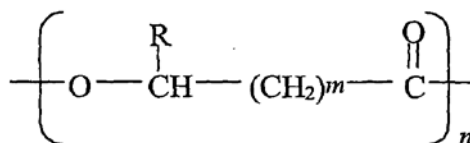
En la sociedad moderna actual, el uso de materiales plásticos a gran escala está llevando a una diversidad de problemas medioambientales serios cada vez mayores. En vista de estos problemas, el desarrollo de resinas plásticas biodegradables ha recibido atención mundial, principalmente las producidas por medio de una tecnología limpia, utilizando fuentes renovables. Las aplicaciones de estos biopolímeros biodegradables con mayores posibilidades de éxito en el mercado incluyen productos tales como materiales desechables, por ejemplo, embalajes, recipientes para cosméticos y agroquímicos tóxicos, artículos médicos y farmacéuticos, como se describe en la introducción de la solicitud de patente brasileña P104005622-1 (PCT/BR04/000237) del mismo solicitante. Una importante familia de los biopolímeros biodegradables es la de los polihidroxialcanoatos (PHA), que son poliésteres sintetizados de forma natural por un gran número de seres vivos. Con más de 170 representantes descritos en la literatura, el interés comercial en los PHA está directamente relacionado no sólo con la biodegradabilidad, sino también con sus propiedades termo-mecánicas y con sus costes de producción. De esta forma, únicamente algunos PHA han encontrado aplicación industrial, siendo los más representativos el PHB (poli-3-hidroxibutirato), el PHB-V (poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato)), el P4HB (poli(4-hidroxibutirato)), el P3HB4HB (poli(3-hidroxibutirato-co-4-hidroxibutirato)) y algunos PHAmcl (polihidroxialcanoatos de cadena media), siendo el representante típico de esta última familia el PHHx (polihidroxihexanoato).

20

25

30

La estructura química de los PHA puede describirse como una cadena polimérica formada por repeticiones de la siguiente unidad:



en la que R es un grupo alquilo o alquenoilo de longitud variable, y m y n son números enteros, m asumiendo R y m en los polímeros antes mencionados los siguientes valores:

40

PHB: R=CH₃, m=1

PBH-V: R=CH₃ o CH₃-CH₂, m=1

45

P4HB: R=H, m=2

P3HB-4HB: R=H o CH₃, m=1 or 2

PHHx: R=CH₃-CH₂-CH₂-, m=1

El gran desarrollo de las ciencias naturales en las últimas dos décadas, particularmente en el campo de la biotecnología, ha permitido el uso de los más diversos organismos, naturales o modificados genéticamente, en la producción comercial de PHA. Especialmente relevante para la presente divulgación es el uso de determinadas cepas bacterianas, que son capaces de producir y acumular cantidades importantes de estos polímeros en su interior. Cultivadas en condiciones específicas, que permiten alcanzar una alta densidad celular, un alto contenido de polímero intracelular y resultan compatibles con el proceso industrial, estas cepas bacterianas pueden usar diferentes materias primas renovables, tales como la caña de azúcar, las melazas o los extractos de celulosa hidrolizada. Aunque se han realizado intentos para aplicar las células bacterianas en la naturaleza (sin usar agentes solubilizantes de PHA), como material moldeable, conforme se divulga en la patente de EE.UU. nº 3107172, las aplicaciones comerciales de los PHA en la mayoría de los casos precisan una pureza lo suficientemente alta como para conseguir las propiedades plásticas deseadas. Con el fin de obtener los niveles adecuados de pureza para el procesamiento del biopolímero, especialmente de los PHA, existen fases normalmente requeridas en las cuales es

50

55

60

indispensable el uso de disolventes para la extracción y recuperación del PHA de la biomasa residual.

En la patente EPA-01455233 A2 se describen varias posibilidades para llevar a cabo la digestión de una suspensión acuosa de células que contienen PHA, usando enzimas y/o tensioactivos para solubilizar el material celular que no es PHA, considerando que las enzimas son muy caras y no se pueden recuperar en el proceso, al contrario de lo que ocurre cuando se usa el disolvente. También se precisa una alta dilución del material celular, lo que lleva a un alto volumen de residuos generados en el proceso.

Los procedimientos de extracción propuestos habitualmente consisten, básicamente, en exponer la biomasa celular seca o húmeda que contiene el biopolímero a un contacto intensivo con un disolvente que lo solubiliza, seguido de una etapa en la que se separa el residuo celular. A continuación, la solución que contiene el biopolímero recibe la adición de un agente insolubilizante, lo que induce su precipitado en el disolvente (véase, por ejemplo, la patente brasileña PI 9103116-8, presentada el 16 de julio de 1991 y publicada el 24 de febrero de 1993).

En los procesos de extracción a través de disolventes orgánicos, los disolventes usados son hidrocarburos parcialmente halogenados, tales como el cloroformo (patente US-3275610), el cloruro de metileno-etanol (documento US-3044942), los cloroetanos y los cloropropanos con un punto de ebullición dentro del intervalo de 65 a 170 °C, el 1,2-dicloroetano y el 1,2,3-tricloropropano (patentes EP-0014490 B y EP-2446859).

Otros compuestos halogenados, tales como diclorometano, dicloroetano y dicloropropano, se citan en las patentes de EE.UU. 4.562.245 (1985), 4.310.684 (1982), 4.705.604 (1987) y en la patente europea 036.699 (1981) y en la patente alemana 239.609 (1986).

Los procedimientos de extracción y purificación de biopolímeros de la biomasa que usan disolventes halogenados, están hoy día totalmente prohibidos, debido a que son muy agresivos para el medio ambiente y para la salud humana. Por lo tanto, un disolvente que se puede usar como un potencial extractor del biopolímero de una biomasa celular debe primeramente cumplir la condición de no ser agresivo con el medio ambiente

En este sentido, la patente brasileña PI 9302312-0 (presentada en 1993 y concedida el 30 de abril de 2002) presenta un procedimiento de extracción de biopolímero de la biomasa bacteriana que usa como disolventes alcoholes de cadena larga con 3 carbonos o los acetatos derivados de los mismos. Esta patente prefiere alcohol isoamílico (3-metil-1-butanol), acetato de amilo (o éster amiloacético) y aceite condensado, una mezcla de alcoholes altos obtenida como subproducto de la fermentación alcohólica y que tiene como componente principal al alcohol isoamílico. Esta patente se caracteriza también por usar un único disolvente como extractor y purificador, sin precisar el uso de un agente insolubilizante o contra-disolvente y/o un no disolvente mínimo. La precipitación del soluto (biopolímero) de la solución de PHA se realiza mediante el enfriamiento de la solución.

La patente de EE.UU. 6.043.063 (presentada el 14 de abril de 1998 y concedida el 28 de marzo de 2000), la patente de EE.UU. 6.087.471 (presentada el 14 de abril de 1998 y concedida el 11 de junio de 2000) y la solicitud de patente internacional WO-98/46783 (presentada el 15 de abril de 1997) mencionan una extensa lista de disolventes no halogenados, que podrían usarse potencialmente como disolventes para la extracción de biopolímero de la biomasa, pero muchos de ellos presentan características tales como una difícil manipulación industrial, toxicidad, además de un alto coste. En dicha extensa lista, que incluye también los disolventes citados en la patente brasileña PI 9302312 0, únicamente un pequeño número de disolventes presentan potencial para usarse comercialmente para la extracción de biopolímero de la biomasa vegetal o bacteriana, bien debido a problemas relacionados con la incompatibilidad con el biopolímero, o debidos a su toxicidad, explosividad y a su elevado coste.

Debido a que los biopolímeros son termosensibles, es decir cuando se someten a temperaturas por encima de un valor determinado se degradan de forma irreversible, pierden peso molecular, lo que puede afectar definitivamente a las propiedades que los caracterizan como termoplásticos, es fundamental tener presente que la lista de disolventes con potencial para ser utilizados industrialmente se vuelve incluso más restringida. El potencial para el uso industrial del disolvente elegido para estimular la extracción del biopolímero aumentará si se asocia con un procedimiento adecuado que permita extraer el biopolímero sin producir alteraciones significativas en su peso molecular. Aunque diversas aplicaciones usan PHA con peso molecular bajo en el intervalo de 10.000 a 50.000, son deseables pesos moleculares superiores a 500.000 Da en un intervalo mucho mayor de aplicaciones comerciales.

Con el fin de producir polihidroxialcanoatos (PHA) con peso molecular lo más cercano posible al peso molecular original, es decir del PH dentro de la célula, es importante considerar el caso en el que se necesita calentar los disolventes de PHA a más de 70 °C para solubilizar el biopolímero; cuando más tiempo permanezca expuesto a esta temperatura durante el procesamiento, más se degradará, hecho que irremediablemente puede alterar sus propiedades termoplásticas, como se trata en la solicitud de patente anterior mencionada anteriormente P104005622-1 (PCT/BR04/000237), del mismo solicitante. Por ejemplo, el polihidroxibutirato, que inicialmente contiene un peso molecular de 1.000.000 Da y presentado a una extracción en alcohol isoamílico a 110 °C daría, para un tiempo de 5 minutos de exposición, 951.230 Da; para 15 minutos de exposición, 853.692 Da; para 30 minutos de exposición, 707.410 Da; para 60 minutos, 414.771 Da; y para 90 minutos, 122.230 Da. Considerando que además de la extracción son necesarias otras operaciones, tales como evaporación y secado del disolvente,

para obtener un producto puro con buenas propiedades mecánicas y que estas operaciones muchas veces exponen el biopolímero a situaciones críticas sobre el material, no es difícil imaginar las dificultades inherentes del procesamiento de este tipo de material. Además del disolvente, es deseable tener un proceso adecuado que no degrade térmicamente el producto.

5 Teniendo en cuenta la sensibilidad térmica del biopolímero y a efectos de producir material con alto peso molecular, debería tenerse en cuenta que el potencial para el uso industrial de los disolventes, por ejemplo los disolventes mencionados en la patente de EE.UU. 6,043,063, está íntimamente relacionado con el tiempo de exposición del biopolímero durante el procedimiento de extracción y recuperación a las altas temperaturas que definirán el nivel de degradación térmica sufrida por el biopolímero. En las patentes citadas no se hace referencia a las propiedades del material obtenido, especialmente en relación con el peso molecular del producto.

15 Otro hecho relevante concerniente a la viabilidad industrial de este modo de extracción del PHA es que, dado que es un procedimiento de intenso consumo de energía, la viabilidad del producto también está estrechamente relacionada con la disponibilidad de una fuente de energía renovable de bajo coste. Considerando los hechos expuestos anteriormente, es posible concluir que los procesos industriales para producir PHA deberían contemplar: Cepas de microorganismos que presentan una eficiencia elevada a la hora de convertir la materia prima en polímero, con un sencillo y eficiente protocolo de producción; las materias primas de bajos costes y rendimientos altos; un procedimiento para extraer y purificar el polímero que permita obtener un producto de pureza elevada, conservando el máximo de las características originales del biopolímero, con altos rendimientos y eficiencia, y mediante procedimientos que no son agresivos para el medio ambiente.

25 Además de estos aspectos económicos, dado que es un producto mejor para el medio ambiente, todo el procedimiento del mismo debería ser compatible. Por tanto, debería evitarse el uso de productos dañinos para el medio ambiente en cualquier etapa de producción. Además, la fuente de energía usada para realizar el proceso de producción debería proceder de una fuente renovable. No tendría ningún sentido producir un plástico de bajo impacto ambiental si, por ejemplo, solo se emplean fuentes de energía no renovables.

30 Una energía renovable y barata aliada con la disponibilidad de materias primas baratas, azúcar y meladas, y disolventes naturales obtenidos como subproductos de la fermentación alcohólica hace de la industria del azúcar y del alcohol la cuna ideal para la producción de bioplásticos.

35 Con el objetivo de obtener con eficiencia un PHA de pureza alta y de alto peso molecular a partir de materia prima de bajo coste, la solicitud de patente anterior PI 04005622-1 (PCT/BR2004/000237) del mismo solicitante propone un procedimiento para recuperar PHA de biomasa celular bacteriana, que se obtiene mediante fermentación, en el que dicho procedimiento presenta características de no agresión al medio ambiente, usando disolventes no halogenados.

40 Considerando la idoneidad de los disolventes para llevar a cabo el procedimiento, los últimos usos, como materia prima, una pasta de biomasa celular en suspensión acuosa y con un contenido de material celular seco no inferior a aproximadamente 18 en peso, en el que la pasta se presenta a un disolvente, agitación y calentamiento en un reactor, con el fin de producir una suspensión que comprende disolvente y PHA disuelto, que después se separa, todavía caliente, de los residuos insolubles del resto de la biomasa celular. Después, la solución de PHA y disolvente se enfría hasta una temperatura que permita la precipitación del PHA y se presenta a una microfiltración, con el fin de obtener una pasta de PHA con una concentración de Pa. de aproximadamente al 5 % o más, pasta que se calienta y agita de nuevo mediante inyección de vapor de agua, con el fin de eliminar el disolvente y formar una suspensión acuosa de gránulos de PHA, que se someterán a una separación final.

50 Usando los disolventes indicados en el procedimiento anterior descrito anteriormente, la concentración del PHA disuelto en el disolvente es inferior al 5 %, lo que requiere una operación de microfiltración con el fin de permitir que dicha concentración de PHA en la suspensión alcance un valor mínimo, que permita la continuidad del procedimiento en términos de viabilidad económica. Con el fin de conservar el peso molecular del biopolímero, la solución se enfría rápidamente antes de microfiltrar.

55 Por tanto, en el procedimiento anterior, el requisito de energía es relativamente grande, ya que el gran volumen de suspensión diluida inicialmente calentada se enfría y después se vuelve a calentar antes de la evaporación del disolvente. Además, este procedimiento requiere instalaciones provistas de equipos de alto coste necesarios para llevar a cabo las etapas de enfriamiento rápido y de microfiltración. Considerando, la baja solubilidad del PHA en los disolventes mencionados, el volumen de los disolventes en circulación requeridos en este procedimiento es alto, requiere planta de bombeo y equipos más grandes, además de mayores cantidades de energía eléctrica y térmica para operaciones y evaporación del disolvente.

65 El documento EP 0 479 043 A1 divulga un procedimiento para obtener un polihidroxialcanoato, sintetizado intracelularmente por un microorganismo, del material celular de una suspensión celular acuosa fermentada, procedimiento en el que al menos parte de la solución de fermentación o del agua contenida en la solución de fermentación, se elimina de la suspensión celular, tras lo cual el material celular se trata con un disolvente acuoso

para el polihidroxialcanoato, que es inmiscible con agua y que tiene un punto de ebullición inferior a 100 °C, con o sin la adición de agua, de modo que la mezcla de extracción formada se agita a temperaturas desde la temperatura ambiente hasta el punto de ebullición del disolvente orgánico y se deja reposar, con o sin centrifugación, formando una fase acuosa y una orgánica, y la fase orgánica que contiene el polihidroxialcanoato en forma disuelta se separa de la fase acuosa que contiene los residuos celulares en forma sin disolver, procedimiento que se caracteriza porque la fase orgánica se inyecta en agua caliente a una temperatura que es superior al punto de ebullición del disolvente orgánico, hacienda que el disolvente orgánico se evapore y que el polihidroxialcanoato precipite en el agua, siendo el último obtenido del modo habitual. Como disolventes adecuados se divulgan hidrocarburos halogenados, tales como cloruro de metileno, cloroformo y tricloroetileno.

Nonato R.V. y col., "Integrated production of biodegradable plastic, sugar and ethanol", APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, vol. 57, nº 1-2, October 2001, páginas 1-5, describen que el ácido poli 3-hidroxibutírico (PHB) y copolímeros relacionados se pueden producir de forma ventajosa cuando se integran en un molino de caña de azúcar. La energía necesaria para el procedimiento de producción la proporciona la biomasa, las emisiones de dióxido de carbono al medio ambiente son asimiladas fotosintéticamente por el cultivo de caña de azúcar y los residuos se reciclan en los campos de caña y el polímero se puede producir a costes bajos considerando la disponibilidad de una fuente de carbono y energía a precios bajos.

Sumario de la invención

A partir de lo anterior, es un objetivo genérico de la presente invención proporcionar un procedimiento para recuperar PHA de biomasa celular bacteriana, obtenida mediante fermentación, usando disolventes no halogenados que no son agresivos para el medio ambiente, con el fin de generar, por medio de instalaciones relativamente simplificadas y menos consumo de energía, un producto de pureza alta y de alto peso molecular usando materia prima y energía renovables.

De acuerdo con la invención, el procedimiento en cuestión comprende las etapas de:

- i) someter la biomasa celular a operaciones concomitantes de inyección de disolvente de PHA, agitación enérgica y calentamiento rápido en el interior de un reactor con el fin de estimular la rotura de la pared de las células de biomasa y disolución del PHA contenido en esta última, y para formar una suspensión que comprende disolvente de PHA enriquecido con PHA disuelto en una concentración de al menos 2 %, preferentemente superior al 5 %, en peso de la suspensión, y residuos insolubles de la biomasa celular (residuos);
- ii) someter la suspensión formada en el reactor a una etapa de separación para recuperar el disolvente enriquecido con el PHA disuelto de los residuos insolubles de la biomasa celular restante;
- iii) someter la solución de disolvente de PHA enriquecido con PHA a operaciones de agitación y lavado con agua y/o vapor a una temperatura que es suficiente y adecuada para estimular la eliminación, mediante evaporación, de casi todo el disolvente de PHA y la precipitación del PHA, con el fin de formar una suspensión que comprende PHA precipitado en agua el disolvente restante;
- iv) someter la suspensión del PHA precipitado a evaporación del disolvente restante hasta la depleción del mismo a través de la inyección de vapor en dicha suspensión de PHA, con el fin de obtener partículas de PHA purificado en suspensión acuosa; v) enfriar la suspensión en medio acuoso, del que se deplecionó el disolvente de PHA, hasta aproximadamente 45 °C o menos, y separar las partículas de PHA de dicha suspensión; y
- vi) someter las partículas de PHA separado a una etapa de secado.

Con el fin de extraer el PHA de la biomasa celular fermentada, el procedimiento propuesto en el presente documento usa al menos uno de los disolventes seleccionados de los grupos siguientes: grupo 1: formiato de metilo, formiato de etilo, formiato de propilo, formiato de butilo, formiato de isoamilo, formiato de pentilo y formiato de caproílo (o de hexilo); grupo 2: propionato de isopropilo, propionato de isoamilo, propionato de caproílo (o de hexilo); grupo 3: butirato de metilo, butirato de propilo, butirato de isopropilo, butirato de isoamilo, butirato de ventilo (amilo), butirato de caproílo (o de hexilo); grupo 4: isobutirato de metilo, isobutirato de etilo, isobutirato de butilo, isobutirato de propilo, isobutirato de isopropilo, isobutirato de isoamilo, isobutirato de ventilo (amilo), isobutirato de caproílo; grupo 5: valerato de propilo, valerato de isopropilo, valerato de butilo, valerato de isobutilo, valerato de isoamilo (valerato de 3-metil-1-butil), valerato de ventilo (amilo) y valerato de caproílo (o de hexilo); grupo 6: isoamilato de metilo (isovalerato) (3-metil-1-metil butanoato), isoamilato de etilo (isovalerato) (3-metil-1etil butanoato), isoamilato de propilo (isovalerato) (3-metil-1-propil butanoato), isoamilato de isopropilo (isovalerato) (butanoato de 3-metil-1-isopropilo), isoamilato de butilo (isovalerato) (3-metil-1-butil butanoato), isoamilato de isobutilo (isovalerato) (butanoato de 3-metil-1-isobutilo), isoamilato de isoamilo (isovalerato) (butanoato de 3-metil-1-isoamilo), isoamilato de pentilo (isovalerato) (amilo) (butanoato de 3-metil-1-pentilo o de amilo) e isoamilato de caproílo (isovalerato) (hexilo).

El procedimiento como se ha descrito es relativamente simple, usa fuentes de energía renovable y materia prima, ya que se asocia con alcohol y producción de azúcar a partir de caña de azúcar, es compatible con el medio ambiente y la salud humana, y define una alternativa económica para extraer y recuperar los polihidroxialcanoatos (PHA) a gran escala.

Breve descripción de las figuras

5 La invención descrita más adelante presenta sus etapas ilustradas a modo de ejemplo en un diagrama de flujo, que se representa en la única figura 1 de los dibujos adjuntos.

Descripción detallada de la invención

10 A continuación se describe una lista de definiciones de los términos usados en la descripción de la presente invención:

15 “Alqueno” significa una cadena carbónica insaturada, desde C₁ a C_n, en la que n varía desde 2 hasta aproximadamente 20, cuya cadena carbónica puede ser lineal, ramificada o cíclica, y la insaturación puede ser monoinsaturada, es decir, con un enlace doble o triple en la cadena carbónica; o poliinsaturada, es decir, con dos o más enlaces dobles o con dos o más enlaces triples o incluso con uno o más enlaces dobles y uno o más enlaces triples en la cadena carbónica.

“Alquilo” significa una cadena carbónica saturada, desde C₁ a C_n, en la que n varía desde 2 hasta aproximadamente 20, cuya cadena carbónica puede ser lineal, ramificada o cíclica.

20 “Biomasa Celular” significa una biomasa procedente de cualquier microorganismo o planta, que sea capaz de producir PHA de forma natural o por medio de modificación genética, con el fin de convertirla en un productor de PHA o un alto productor de PHA.

25 “Comprende” o “comprender” significa que pueden añadirse, o estar presentes, otras etapas, u otros estadios, u otros compuestos u otros ingredientes, que no afectan al resultado final. Este término se puede sustituir por, o sustituye los términos: “constituido por”, “formado por”, “constituido esencialmente por” y “formado esencialmente por”.

“Da” significa Dalton, la unidad de medida del peso molecular de polímeros.

30 “Extraer polihidroxialcanoatos de una biomasa” o “extracción de polihidroxialcanoatos de una biomasa” significa extraer o la extracción de un PHA determinado producido por una biomasa que produce un solo tipo de PHA y, adicionalmente, también puede significar extraer o la extracción de más de un tipo de PHA producido por una biomasa, para situaciones en las que la biomasa celular productora de PHA produce más de un solo tipo de PHA.

35 “Extracto Bruto” significa la suspensión constituida por el disolvente de PHA enriquecido con el PHA extraído de la masa celular de PHA que contiene, disuelta en ella, agua e impurezas extraídas de la masa celular, y por los sólidos insolubles, que son el residuo de la biomasa celular de la que se extrajo el PHA.

“Sustancialmente presión atmosférica” significa una presión muy cercana a la atmosférica, es decir igual o ligeramente superior o inferior a la presión atmosférica.

“Reactor de Extracción” significa el equipo en el que se procesa la operación de extracción del PHA de la biomasa celular productora de PHA.

40 “Enfriamiento rápido” de una corriente (solución o suspensión) significa: enfriar esta corriente (solución o suspensión) en algunos segundos, por medio de expansión, a través de intercambio térmico con otra corriente más fría y/o por enfriamiento por medio de intercambiadores térmicos.

“Disolvente” significa una sustancia capaz de disolver otra sustancia denominada soluto, con el fin de formar una mezcla denominada solución, de un soluto uniformemente dispersado en el disolvente, en relación con el tamaño molecular o el tamaño iónico.

45 “Disolvente de PHA” significa una sustancia capaz de disolver los polihidroxialcanoatos.

“Disolvente enriquecido con PHA” o “solución de disolvente enriquecido con PHA” significa una solución de disolvente de PHA que contiene el PHA extraído de la biomasa celular productora de PHA.

50 “Virtualmente libre de” o “prácticamente libre de” significa “tener una cantidad muy pequeña de” o “tener presencia de restos de” o “presentar una cantidad insignificante de” o “presentar una cantidad casi imperceptible de”. Hay un número relativamente grande de publicaciones que describen la extracción de PHA por medio de disolventes no halogenados de microorganismos o de fuentes de biomasa vegetal. No obstante, cuando se desee aplicar las enseñanzas descritas a escala comercial, existe una gran dificultad en la obtención de un producto en el que las propiedades originales del biopolímero intracelular se conservan sustancialmente, cuyas características son, la mayoría del tiempo, fundamentales para elaborar productos comerciales. Se observa que en la mayoría de dichas publicaciones se presta poca atención a la termosensibilidad del producto a temperaturas elevadas. La mayoría de los disolventes no halogenados mencionados como candidatos para usar en la extracción de PHA presentan una solubilidad baja para este soluto y requieren temperaturas elevadas, normalmente por encima de 70 °C, para la extracción y recuperación de PHA. Cuando se desea procesar la extracción de PHA con dichos disolventes a escala comercial, normalmente los tiempos necesarios para la recuperación de PHA son demasiado largos, degradándolos térmicamente de un modo irreversible. El producto obtenido de este modo, en función del tiempo de exposición a una temperatura elevada, queda restringido a un número muy limitado de aplicaciones en la industria, o incluso a cualquier otra aplicación.

65 La presente invención se refiere a un proceso a escala industrial, en el que las etapas de procesamiento se combinan de un modo tal que permita: a) minimizar el tiempo de exposición a altas temperaturas de la mayor parte del PHA extraído de la biomasa celular, utilizando disolventes no halogenados, lo que permite minimizar su

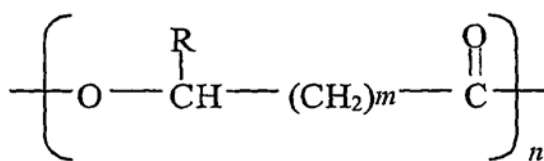
degradación, con el fin de preservar al máximo sus propiedades originales, especialmente su peso molecular;

b) obtener un producto de alta pureza, normalmente superior al 99%, conservando el color natural del biopolímero y con la ausencia virtual de disolvente residual, sin que haya necesidad de incluir en el proceso etapas adicionales específicas para decolorar y purificar el PHA producido;

c) obtener un alto grado de recuperación de PHA de la biomasa, normalmente superior al 90%;

d) usar, de una manera integrada, materias primas renovables y fuentes de energía originadas por la industria del azúcar y del alcohol, incrementando de esta forma los beneficios de los grupos industriales que producen azúcar y alcohol.

Los procedimientos de la presente invención se pueden aplicar a los PHA producidos por microorganismos o plantas naturales o genéticamente modificados o a PHA producidos sintéticamente. El polihidroxialcanoato o PHA es un polímero constituido por repeticiones de la unidad siguiente:



en la que R es un grupo alquilo o alqueniilo de longitud variable, y m y n son números enteros, m asumiendo R y m en los polímeros antes mencionados los siguientes valores:

PHB: R=CH₃, m=1

PHB-V: R=CH₃ o CH₃-CH₂, m=1

P4HB: R=H, m=2

P3HB-4HB: R=H o CH₃, m=1 o 2

PHHx: R=CH₃-CH₂-CH₂-, m=1

La presente invención se aplica a los PHA recuperados de biomasa de microorganismos, preferentemente a PHB (Poli-3-hidroxibutirato), PHB-V (poli(hidroxibutirato-cohidroxivalerato), P4HB (poli-4-hidroxibutirato, P3HB4HB (poli(3-hidroxibutirato-co-4-hidroxibutirato)) y algunos PHAmcl (polihidroxialcanoatos de cadena media), siendo el representante típico de esta última familia el PHHx (polihidroxihexanoato).

Procedimiento para extraer PHA usando disolventes no halogenados, con un tiempo de exposición corto del biopolímero a la condición de degradación térmica

La presente invención se refiere a un procedimiento que usa un material fermentado de biomasa celular bacteriana y que, en una etapa de extracción, se somete a operaciones concomitantes de inyección de disolvente de PHA, preferentemente, en la forma líquida calentada y la forma de vapor, de agitación enérgica y calentamiento rápido en un reactor, con el fin de provocar rápidamente calentamiento de la biomasa celular hasta una temperatura entre aproximadamente 90 °C hasta la temperatura de ebullición del disolvente, a la presión sustancialmente atmosférica y la disolución de PHA contenida en la biomasa y para generar un extracto bruto definido por una suspensión que comprende disolvente de PHA enriquecido disuelto en una concentración de al menos un 2 % y, con frecuencia, superior al 5 % en peso de la suspensión, y residuos insolubles de la biomasa celular.

En una forma preferida de la invención, en la que la biomasa celular bacteriana se introduce en la forma seca en la operación de extracción, el extracto bruto obtenido en la etapa de extracción está constituido por una fase líquida, que comprende disolvente de PHA enriquecido con PHA, y una fase sólida, que está definida por residuos insolubles de la biomasa celular residual (residuos).

En otra forma de llevar a cabo la invención, la biomasa celular bacteriana se lleva a una etapa de extracción en una forma de suspensión acuosa, preferentemente concentrada por encima del 10 % del material seco (peso/peso) en ella y también denominada pasta, con el fin de obtener un extracto bruto que consiste en una fase líquida que comprende disolvente de PHA enriquecido con PHA y el agua restante de la biomasa celular; una fase sólida definida por los residuos insolubles de la biomasa celular residual; y una fase de vapor que contiene agua y vapores del disolvente de PHA. El agua y los vapores del disolvente de PHA, que se generan en varias etapas del procedimiento, se condensan y se separan en dos fases líquidas: una fase rica en disolvente, que retorna al procedimiento en la fase de extracción y recuperación de PHA; y una fase pobre en disolvente, que se recircula en el procedimiento para permitir recuperar el disolvente de PHA contenido en ella.

Este procedimiento, además de calentar la biomasa celular, también estimula el efecto de eliminar el exceso de agua suministrada con la pasta en forma de un vapor, que es una mezcla binaria consistente en disolvente de PHA y agua. La fase de vapor, que sustancialmente contiene la mayor parte del agua introducida con la biomasa en el reactor, se puede extraer después del reactor para condensarla después, dejando atrás una suspensión que
 5 consiste en una solución de disolvente de PHA enriquecida con PHA y una pequeña fracción de agua disuelta en el disolvente, además de residuos insolubles de la biomasa celular extraída.

En el procedimiento para extraer y recuperar PHA se usa al menos un disolvente de PHA, seleccionado de los grupos siguientes:

10 Grupo 1 de disolventes consistente en: formiato de metilo, formiato de etilo, formiato de propilo, formiato de butilo, formiato de isoamilo, formiato de pentilo (amilo) y formiato de caproílo (o hexilo) y mezclas de estos disolventes, más preferentemente formiato de propilo, formiato de butilo, formiato de isoamilo, formiato de ventilo e, incluso más preferentemente, formiato de isoamilo.

15 Grupo 2 de disolventes consistente en: propionato de etilo, propionato de isopropilo, propionato de isoamilo, propionato de caproílo (o hexilo) y mezclas de estos disolventes y, más preferentemente, propionato de isopropilo, propionato de isoamilo e, incluso más preferentemente, propionato de isoamilo.

20 Grupo 3 de disolventes consistente en: butirato de metilo, butirato de propilo, butirato de isopropilo, butirato de isoamilo, butirato de pentilo (amilo), butirato de caproílo (o hexilo) y mezclas de estos disolventes, y, más preferentemente, butirato de propilo, butirato de isopropilo, butirato de isoamilo, butirato de pentilo (amilo) e, incluso más preferentemente, butirato de isoamilo (butirato de 3-metil-1-butilo).

25 Grupo 4 de disolventes consistente en: isobutirato de metilo, isobutirato de propilo, isobutirato de isopropilo, isobutirato de isoamilo, isobutirato de pentilo (amilo), isobutirato de caproílo (o hexilo) y mezclas de estos disolventes, y, más preferentemente, isobutirato de propilo, isobutirato de isopropilo, isobutirato de isoamilo, isobutirato de pentilo (amilo) e, incluso más preferentemente, isobutirato de isoamilo (butirato de 3-metil-1-butilo).

30 Grupo 5 de disolventes consistente en: valerato de propilo, valerato de isopropilo, valerato de butilo, valerato de isobutilo, valerato de isoamilo (3-metil-1-butilo), valerato de pentilo (amilo) y valerato de caproílo (o hexilo) y mezclas de estos disolventes, más preferentemente valerato de propilo, valerato de isopropilo, valerato de butilo, valerato de isobutilo, valerato de isoamilo, valerato de pentilo (amilo) e, incluso más preferentemente, valerato de isoamilo.

35 Grupo 6 de disolventes consistente en: isoamilato de metilo (isovalerato) (3-metil-1-metil butanoato), isoamilato de etilo (isovalerato) (3-metil-1-etil-butanoato), isoamilato de propilo (isovalerato) (3-metil-1-propil-butanoato), isoamilato de isopropilo (isovalerato) (3-metil-1-isopropil-butanoato), isoamilato de butilo (isovalerato) (3-metil-1-butil-butanoato), isoamilato de isobutilo (isovalerato) (3-metil-1-isobutil-butanoato), isoamilato de isoamilo (isovalerato) (3-metil-1-isoamil-butanoato), isoamilato de pentilo (isovalerato) (amilo) (butanoato de 3-metil-1-pentilo o de amilo) e isoamilato de caproílo (isovalerato) (hexilo), y mezclas de estos disolventes y, más preferentemente, isoamilato de propilo (isovalerato), isoamilato de isopropilo (isovalerato), isoamilato de butilo (isovalerato), isoamilato de isobutilo (isovalerato), isoamilato de isoamilo (isovalerato), isoamilato de ventilo (isovalerato) (amilo) e, incluso más preferentemente, isoamilato de isoamilo (isovalerato).

40 En cualquiera de las formas de invención, el extracto bruto obtenido, que es efluente de la etapa de extracción, se somete después a un procedimiento de separación de sólidos insolubles de la solución de disolvente de PHA enriquecido con PHA, por ejemplo mediante filtración, centrifugación, más preferentemente mediante filtración, que genera una corriente filtrada de sólidos insolubles y que comprende la solución de PHA enriquecida con PHA y una torta que contiene los sólidos insolubles separados.

45 El uso de los disolventes considerados en el presente documento permite que la suspensión del disolvente de PHA enriquecida con PHA disuelto presente una concentración de PHA de al menos aproximadamente un 2 % en peso y, para una parte relevante de los disolventes escogidos, al menos superior a aproximadamente 5 % en peso de la suspensión. Cuando los disolventes usados son aquéllos con una solubilidad del PHA igual o superior a
 50 aproximadamente 5 % en peso, la etapa de eliminar el disolvente de la solución de PHA se realiza sin pasar por las etapas intermedias de enfriar y microfiltrar. La solución que contiene PHA disuelto y libre de residuos insolubles de biomasa, preferentemente a la temperatura de extracción, se introduce después en un flujo de vapor, preferentemente de un modo pulverizado y, después, se expande instantáneamente en un reactor, que se mantiene a una presión que varía desde vacío hasta la presión sustancialmente atmosférica, preferentemente a vacíos de 100
 55 a 600 mmHg, en el que se generan: un flujo de vapor binario que contiene agua y una parte sustancial del disolvente de PHA que es parte de la solución de alimentación y una suspensión de partículas de PHA finamente divididas en agua y una fracción de disolvente residual resultante de la condensación de parte del vapor introducido. Esta suspensión se somete después a evaporación del disolvente residual final hasta depleción de la misma en el líquido restante (licor madre) mediante la inyección de vapor. Por tanto, al final del proceso se obtiene una suspensión de
 60 partículas de PHA finamente dispersadas en agua. Esta suspensión se enfría rápidamente hasta aproximadamente 45 °C o menos y se somete a un proceso para separar las partículas de PHA dispersas en esta suspensión, por ejemplo filtrando y lavando la torta filtrada, que contiene las partículas de PHA, con agua sustancialmente libre de disolvente. Las partículas de PHA obtenidas de este modo se someten después a un proceso de secado, obteniendo PHA e forma de polvo, que presenta un nivel de pureza alto, niveles muy bajos de disolvente residual, color, cenizas
 65 e impurezas co un rendimiento global muy alto, es decir una cantidad de PHA recuperada en relación con el PHA contenido en la biomasa original, superior a aproximadamente 90 % (peso/peso) y pesos moleculares superiores a

300.000 Da, normalmente de 400.000 a 800.000 Da.

De acuerdo con la invención, la eliminación del disolvente de la solución de PHA se lleva a cabo en una cámara de evaporación pulverizando directamente la solución de PHA en un flujo de vapor, seguido de precipitación de PHA en la mezcla de disolvente y agua.

De acuerdo con un modo de llevar a cabo la invención, el vapor usado para eliminar el disolvente de la solución de PHA es un vapor supercalentado en relación con la presión de operación en la cámara de evaporación. Debe entenderse que la cámara de evaporación se podría mantener a una presión inferior a la presión atmosférica o a una presión sustancialmente atmosférica. En modo de llevar a cabo la invención, la eliminación del disolvente de la solución de PHA se lleva a cabo inyectando directamente la solución en agua y vapor, y calentando en agitación en un reactor mantenido a una presión inferior a la presión atmosférica o a una presión sustancialmente atmosférica. En la presente divulgación, los disolventes seleccionados y pertenecientes a los grupos de 1 a 6 se pueden obtener mediante, por ejemplo, reacciones conocidas de síntesis orgánica entre un alcohol y un ácido carboxílico en presencia de un catalizador ácido (ion H+) y las denominadas reacciones de esterificación (MORRISON, R. e BOYD, R., Química Organica, 9ª ed., Calouste Gulbenkian, Lisboa, Portugal, pág. 991-1016, 1990 e Solomons, T.W. G., Organic Chemistry, 2ª ed., John Wiley & Sons, Inc., New York, EE.UU., pág. 749-801, 1980). Particularmente en el Grupo 6, en el que el ácido implicada en la reacción de esterificación ácido 3-metil-1-butanoico o ácido isoamílico, debe enfatizarse que se puede obtener mediante, por ejemplo, reacciones conocidas de síntesis orgánica entre un alcohol y oxidación catalizada con ácido, alcohol isoamílico (3-metil-1-butanol), alcohol primario, mediante un proceso de catálisis de transferencia de fase como de detalla en la literatura de química orgánica tradicional (p. ej., MORRISON, R. e BOYD, R., Química Organica, 9ª ed., Calouste Gulbenkian, Lisboa, Portugal, pág. 616-618, 471 e Solomons, T.W. G., Organic Chemistry, 2ª ed., John Wiley & Sons, Inc., New York, EE.UU., pág. 654-657, 1980).

El uso de los disolventes seleccionados descritos anteriormente presenta la ventaja de solubilizar aproximadamente 2-20 veces el PHA que, por ejemplo, los disolventes descritos en la patente PI 9302312-0, en la solicitud de patente PI 04005622-1 (PCT/BR04/000237) y en la patente de EE.UU. 6,043,063, tal como, por ejemplo, acetato de isoamilo, acetato de butilo, 1-hexanol, alcohol amílico, alcohol isoamílico y propionato de propilo. El grado de solubilidad depende del disolvente usado y de la temperatura de extracción escogida.

La buena estabilidad conseguida con el uso de los disolventes seleccionados como objeto de la invención asociada con la metodología descrita en el presente documento permite:

- a) obtener una extracción rápida y eficiente del PHA de la biomasa de microorganismos;
- b) evaporar instantáneamente una cantidad sustancial del disolvente contenido en la solución de PHA inyectada en el flujo de vapor y expandida en una cámara de evaporación, preferentemente al vacío, en el que se recupera una parte relevante del calor sensible contenido en la solución de PHA alimentada, al mismo tiempo estimula la precipitación de PHA en agua condensada del vapor, que simultáneamente se enfría con el vapor y que sale del sistema; conteniendo esto último parte del agua admitida en el vapor inyectado y una cantidad sustancial del disolvente contenido en la solución de PHA introducido junto con ella;
- c) para los disolventes con una solubilidad del PHA igual o superior al 5 % en peso usando una etapa como se describe en el punto b), eliminando las etapas adicionales de enfriamiento de PHB, cristalización o precipitación y concentración mecánica (o con membranas), de modo que se reduce considerablemente la unidad de evaporación de la suspensión de PHB en el disolvente, dispensando simultáneamente la necesidad de añadir un agente de insolubilización del PHA (contradisolvente);
- d) para los disolventes cuya solubilidad del PHA entre aproximadamente 2 % y aproximadamente 5 % en peso usando una etapa como se describe en el punto b), reduciendo el tamaño del enfriamiento de PHB, cristalización o precipitación, y concentración mecánica (o con membranas), de modo que se dispensa la necesidad de añadir un agente de insolubilización del PHA (contradisolvente);
- e) Mediante acción con vapor, como se describe en el punto b, evaporación de disolvente y precipitación del PHA, que reduce las posibilidades de producir daños en el peso molecular, eliminando simultáneamente mediante acción termomecánica las impurezas disueltas en el disolvente de PHA cuando están en contacto, transfiriendo a la fase de agua; permitiendo además obtener partículas de PHA finamente divididas, que facilita la eliminación del disolvente residual y las impurezas, y, también, la posterior operación de secado;
- f) mediante la acción impulsada del vapor, de acuerdo con el procedimiento descrito en el punto b, estimular la pulverización de la solución de PHA en el flujo de vapor; y
- g) reducir significativamente las cantidades de disolvente en circulación requeridas en el procedimiento de extracción de PHA, que implica una reducción proporcional del tamaño de una parte sustancial del equipo que se puede usar industrialmente y que, además de estimular una reducción acentuada del consumo de energía térmica y eléctrica requerida en el proceso, permite reducir significativamente las inversiones en el procedimiento de extracción y purificación.

Ejemplos

Ejemplo 1: extracción y recuperación usando propionato de isoamilo como disolvente.

5 A un matraz de destilación de fondo redondo de 500 ml se añadieron 50 g de biomasa de *Alcaligenes eutrophus*, que contienen un 78,4 % de material seco y 58,8 % de PHB con peso molecular de 1.000.000 Da y 300 g de propionato de isoamilo. La suspensión se sometió después, en agitación, a evaporación de una fracción de disolvente y agua, usando una manta térmica acoplada al matraz de destilación. El vapor binario generado de este 2do se llevó a un condensador de tubo recto (de tipo Liebig) para condensación y el condensado resultante se
10 recogió en un recipiente Erlenmeyer. La suspensión se mantuvo en un proceso de evaporación en agitación hasta alcanzar la temperatura de extracción. La temperatura se leyó en un termómetro de mercurio fijado a una de las boquillas del matraz y se mantuvo en contacto con la fase de vapor dentro del matraz. La temperatura de extracción se alcanzó después de transcurrido un tiempo de evaporación de aproximadamente 3 minutos y la temperatura de ebullición de la mezcla pasó de aproximadamente 95 °C (temperatura inicial) a aproximadamente 115 °C
15 (temperatura de extracción). Después, la suspensión se mantuvo en un régimen de reflujo condensado en agitación durante aproximadamente 5 minutos a la temperatura de 115 °C (temperatura de extracción) y después, todavía caliente, se filtró en un papel de filtro para separar la parte insoluble de la parte disuelta en el disolvente filtrado. El material filtrado caliente que contiene aproximadamente 8,82% (p/p) de PHB solubilizado se enfrió después para precipitar el PHB, se concentró mediante filtración, se sometió a evaporación del disolvente y, después, a secado.

20 El PHB obtenido presentó un peso molecular de aproximadamente 558.000 Da. La cantidad de biomasa concentrada usada en las pruebas fue aproximadamente 2,0-3,5 veces mayor que la cantidad necesaria para alcanzar la concentración de saturación de PHB en el disolvente a la temperatura de extracción empleada. Por tanto, se pudo determinar la concentración de la saturación del soluto (PHB) en el disolvente (propionato de isoamilo) para la temperatura de extracción empleada.

25

Ejemplo 2: extracción y recuperación de phb usando butirato de propilo como disolvente.

A un matraz de destilación de fondo redondo de 500 ml se añadieron 50 g de biomasa de *Alcaligenes eutrophus*, que contienen un 78,4 % de material seco y 58,8 % de PHB con peso molecular de 1.000.000 Da y 300 g de butirato
30 de butilo. La suspensión se sometió después, en agitación, a evaporación de una fracción de disolvente y agua, usando una manta térmica acoplada al matraz de destilación. El vapor binario generado de este modo se llevó a un condensador de tubo recto (de tipo Liebig) para condensación y el condensado resultante se recogió en un recipiente Erlenmeyer. La suspensión se mantuvo en un proceso de evaporación en agitación hasta alcanzar la temperatura de extracción. La temperatura se leyó en un termómetro de mercurio fijado a una de las boquillas del
35 matraz y se mantuvo en contacto con la fase de vapor dentro del matraz. La temperatura de extracción se alcanzó después de transcurrido un tiempo de evaporación de aproximadamente 3 minutos y la temperatura de ebullición de la mezcla pasó de aproximadamente 98 °C (temperatura inicial) a aproximadamente 120 °C (temperatura de extracción). Después, la suspensión se mantuvo en un régimen de reflujo condensado en agitación durante aproximadamente 5 minutos a la temperatura de 120 °C (temperatura de extracción) y después, todavía caliente, se
40 filtró en un papel de filtro para separar la parte insoluble de la parte disuelta en el disolvente filtrado. El material filtrado caliente que contiene aproximadamente 3,0% (p/p) de PHB solubilizado se enfrió después para precipitar el PHB, se concentró mediante filtración, se sometió a evaporación del disolvente y, después, a secado. El PHB obtenido presentó un peso molecular de aproximadamente 638.000 Da. La cantidad de biomasa concentrada usada en las pruebas se añadió en exceso de aproximadamente 2,0-3,5 veces mayor que la cantidad necesaria para
45 alcanzar la concentración de saturación de PHB en el disolvente a la temperatura de extracción empleada. Por tanto, se pudo determinar la concentración de la saturación del soluto (PHB) en el disolvente (butirato de butilo) para la temperatura de extracción empleada.

50 Ejemplo 3: extracción y recuperación de phb a partir de biomasa seca usando valerato de isoamilo como disolvente.

A un matraz de destilación de fondo redondo de 500 ml se añadieron 50 g de biomasa de *Alcaligenes eutrophus*, que contienen un 78,4 % de material seco y 58,8 % de PHB con peso molecular de 1.000.000 Da y 300 g de valerato de isoamilo. La suspensión se sometió después, en agitación, a evaporación del disolvente y agua, usando
55 una manta térmica acoplada al matraz de destilación. El vapor binario generado de este modo se llevó a un condensador de tubo recto (de tipo Liebig) para condensación y el condensado resultante se recogió en un recipiente Erlenmeyer. La suspensión se mantuvo en un proceso de evaporación en agitación hasta alcanzar la temperatura de extracción. La temperatura se leyó en un termómetro de mercurio fijado a una de las boquillas del matraz y se mantuvo en contacto con la fase de vapor dentro del matraz. La temperatura de extracción se alcanzó después de transcurrido un tiempo de evaporación de aproximadamente 3 minutos y la temperatura de ebullición de
60 la mezcla pasó de aproximadamente 98 °C (temperatura inicial) a aproximadamente 130 °C (temperatura de extracción). Después, la suspensión se mantuvo en un régimen de reflujo condensado en agitación durante aproximadamente 10 minutos a la temperatura de 130 °C (temperatura de extracción) y después, todavía caliente, se filtró en un papel de filtro para separar la parte insoluble de la parte disuelta en el disolvente filtrado. El material filtrado caliente que contiene aproximadamente 27,8% (p/p) de PHB solubilizado se enfrió después para precipitar el
65 PHB, se concentró mediante filtración, se sometió a evaporación del disolvente y, después, a secado. El PHB obtenido presentó un peso molecular de aproximadamente 735.000 Da. La cantidad de biomasa concentrada usada

en las pruebas se añadió en exceso de aproximadamente 2,0-3,5 veces mayor que la cantidad necesaria para alcanzar la concentración de saturación de PHB en el disolvente a la temperatura de extracción empleada. Por tanto, se pudo determinar la concentración de la saturación del soluto (PHB) en el disolvente (valerato de isoamilo) para la temperatura de extracción empleada.

5 Ejemplo 4: extracción y recuperación de phb a partir de biomasa seca usando isoamilato de isoamilo (isovalerato) (3-metil-1-butanoato de 3-metil-1-butanol) como disolvente.

10 A un matraz de destilación de fondo redondo de 500 ml se añadieron 50 g de biomasa de *Alcaligenes eutrophus*, que contienen un 78,4 % de material seco y 58,8 % de PHB con peso molecular de 1.000.000 Da y 300 g de isoamilato de isoamilo (isovalerato) (3-metil-1-butanoato de 3-metil-1-butanol). La suspensión se sometió después, en agitación, a evaporación del disolvente y agua, usando una manta térmica acoplada al matraz de destilación. El vapor binario generado de este modo se llevó a un condensador de tubo recto (de tipo Liebig) para condensación y el condensado resultante se recogió en un recipiente Erlenmeyer. La suspensión se mantuvo en un proceso de evaporación en agitación hasta alcanzar la temperatura de extracción. La temperatura se leyó en un termómetro de mercurio fijado a una de las boquillas del matraz y se mantuvo en contacto con la fase de vapor dentro del matraz. La temperatura de extracción se alcanzó después de transcurrido un tiempo de evaporación de aproximadamente 3 minutos y la temperatura de ebullición de la mezcla pasó de aproximadamente 98 °C (temperatura inicial) a aproximadamente 125 °C (temperatura de extracción). Después, la suspensión se mantuvo en un régimen de reflujo condensado y en agitación durante aproximadamente 10 minutos a la temperatura de 125 °C (temperatura de extracción) y después, todavía caliente, se filtró en un papel de filtro para separar la parte insoluble de la parte disuelta en el disolvente filtrado. El material filtrado caliente que contiene aproximadamente 9,8% (p/p) de PHB solubilizado se enfrió después para precipitar el PHB, se concentró mediante filtración, se sometió a evaporación del disolvente y, después, a secado. El PHB obtenido presentó un peso molecular de aproximadamente 575.000 Da. La cantidad de biomasa concentrada usada en las pruebas se añadió en exceso de aproximadamente 2,0-3,5 veces mayor que la cantidad necesaria para alcanzar la concentración de saturación de PHB en el disolvente a la temperatura de extracción empleada. Por tanto, se pudo determinar la concentración de la saturación del soluto (PHB) en el disolvente (isovalerato de isoamilo) para la temperatura de extracción empleada.

15

20

25

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para extraer y recuperar polihidroxicanoatos (PHA) a partir de una biomasa celular bacteriana, obteniéndose dicha biomasa mediante fermentación, caracterizada por que comprende las etapas de:

- 5
- i) Someter la biomasa celular a operaciones concomitantes de inyección de disolvente de PHA, agitación enérgica y calentamiento rápido en el interior de un reactor, con el fin de estimular la rotura de la pared de las células de biomasa y la disolución del PHA contenido en el último, y para formar una suspensión que comprende disolvente de PHA enriquecido con PHA disuelto en una concentración de al menos 2 % en peso de la suspensión y los residuos insolubles de la biomasa celular, en el que el disolvente de PHA usado se selecciona de los grupos de disolventes consistentes en formiato de metilo, formiato de etilo, formiato de propilo, formiato de butilo, formiato de isoamilo, formiato de pentilo (amilo) y formiato de caproilo (o hexilo) y mezclas de estos disolventes; propionato de etilo, propionato de isopropilo, propionato de isoamilo, propionato de isopropilo, butirato de isoamilo, butirato de pentilo (amilo), butirato de caproilo (o hexilo) y mezclas de estos disolventes; isobutirato de metilo, isobutirato de propilo, isobutirato de isopropilo, isobutirato de isoamilo, isobutirato de pentilo (amilo), isobutirato de caproilo (o hexilo) y mezclas de estos disolventes; valerato de propilo, valerato de isopropilo, valerato de butilo, valerato de isobutilo, valerato de isoamilo (3-metil-1-butilo), valerato de pentilo (amilo) y valerato de caproilo (o hexilo) y mezclas de estos disolventes; e isoamylato de metilo (isovalerato) (butanoato de 3-metil-1-metilo), isoamylato de etilo (isovalerato) (butanoato de 3-metil-1-etilo), isoamylato de isopropilo (isovalerato) (butanoato de 3-metil-1-isopropilo), isoamylato de butilo (isovalerato) (butanoato de 3-metil-1-butilo), isoamylato de isobutilo (isovalerato) (butanoato de 3-metil-1-isobutilo), isoamylato de isoamilo (isovalerato) (butanoato de 3-metil-1-isoamilo), isoamylato de pentilo (isovalerato) (amilo) (butanoato de 3-metil-1-pentilo o de amilo) e isoamylato de caproilo (isovalerato) (hexilo) y mezclas de estos disolventes;
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
- ii) someter la suspensión formada en el reactor a una etapa de separación para recuperar el disolvente enriquecido con el PHA disuelto de los residuos insolubles de la biomasa celular restante;
- iii) someter la solución de disolvente de PHA enriquecido con PHA a operaciones de agitación y lavado con agua y/o vapor a una temperatura que es suficiente y adecuada para estimular la eliminación, mediante evaporación, de casi todo el disolvente de PHA y la precipitación del PHA, con el fin de formar una suspensión que comprende PHA precipitado en agua el disolvente restante;
- iv) someter la suspensión del PHA precipitado a evaporación del disolvente restante hasta la depleción del mismo a través de la inyección de vapor en dicha suspensión de PHA, con el fin de obtener partículas de PHA purificado en suspensión acuosa; v) enfriar la suspensión en medio acuoso, del que se deplecionó el disolvente de PHA, hasta aproximadamente 45 °C o menos, y separar las partículas de PHA de dicha suspensión; y
- vi) someter las partículas de PHA separado a una etapa de secado.

2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que el disolvente de PHA usado se selecciona del grupo de disolventes que consiste en propionato de isoamilo, butirato de propilo, valerato de isoamilo e isoamylato de isoamilo o mezclas de los mismos.

3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que el disolvente de PHA es propionato de isoamilo.

4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que el disolvente de PHA usado permite presentar una solubilidad de PHA en el mismo de al menos 5 % en peso.

5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que el PHA usado se selecciona del grupo definido por poli-3-hidroxibutirato (PHB), poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato), PHBV y mezclas de estos polímeros y copolímeros.

6. procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, caracterizado por que el PHA se produce mediante fermentación bacteriana usando microorganismos que son capaces de biosintetizar PHA usando, como materia prima principal, azúcares extraídas de caña de azúcar, y porque la fuente principal de energía usada para generar la energía térmica y la energía eléctrica requeridas por el procedimiento es bagazo de caña de azúcar.

7. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que la etapa de inyectar disolvente en la biomasa celular concentrada comprende operaciones de inyectar disolvente de PHA líquido y disolvente de PHA en forma de vapor, con el fin de estimular el calentamiento de la biomasa celular a una temperatura entre 90 °C y la temperatura de ebullición del disolvente a una presión sustancialmente atmosférica.

8. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que la eliminación del disolvente de la solución de PHA se lleva a cabo en una cámara de evaporación pulverizando directamente la solución de PHA en un flujo de vapor, seguido de precipitación de PHA en la mezcla de disolvente y agua.

9. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, caracterizado por que el vapor usado para eliminar el disolvente de la solución de PHA mediante evaporación, inyectando directamente la solución en un flujo de vapor, es

un vapor supercalentado en relación con la presión de operación en la cámara de evaporación.

- 5 10. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, caracterizado por que la eliminación del disolvente de la solución de PHA se lleva a cabo inyectando directamente la solución en un flujo de vapor y en la cámara de evaporación mantenida a una presión inferior a la presión atmosférica.
- 10 11. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, caracterizado por que la eliminación del disolvente de la solución de PHA se lleva a cabo inyectando directamente la solución en un flujo de vapor y en la cámara de evaporación mantenida a una presión sustancialmente atmosférica.
- 15 12. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, caracterizado por que la eliminación del disolvente de la solución de PHA comprende inyectar directamente la solución en agua y vapor y calentando en agitación en un reactor mantenido a una presión inferior a la presión atmosférica.
- 20 13. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, caracterizado por que la eliminación del disolvente de la solución de PHA se lleva a cabo inyectando directamente la solución en agua y calentando en agitación en un reactor mantenido a una presión sustancialmente atmosférica.
- 25 14. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que la biomasa usada en el proceso de extracción es una forma de suspensión acuosa.
- 30 15. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 14, caracterizado por que el disolvente de PHA forma con agua, en una fase de vapor, una mezcla binaria.
- 35 16. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 15, caracterizado por que la etapa de inyectar disolvente en la suspensión de la biomasa celular comprende operaciones de inyectar disolvente de PHA líquido y disolvente de PHA en forma de vapor, con el fin de estimular el calentamiento de la biomasa celular a una temperatura entre 90 °C y la temperatura de ebullición del disolvente a una presión sustancialmente atmosférica y para formar: una fase líquida que comprende disolvente de PHA enriquecida con PHA y el agua estante de la biomasa celular; una fase sólida definida por los residuos insolubles de la biomasa celular residual; y una fase de vapor que contiene agua y vapores del disolvente de PHA.
17. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 16, caracterizado por que comprende la etapa adicional de extraer la fase de vapor que contiene sustancialmente exceso del agua introducida en el interior del reactor a través de la biomasa.
18. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que la biomasa celular procede de microorganismos naturales o genéticamente modificados.

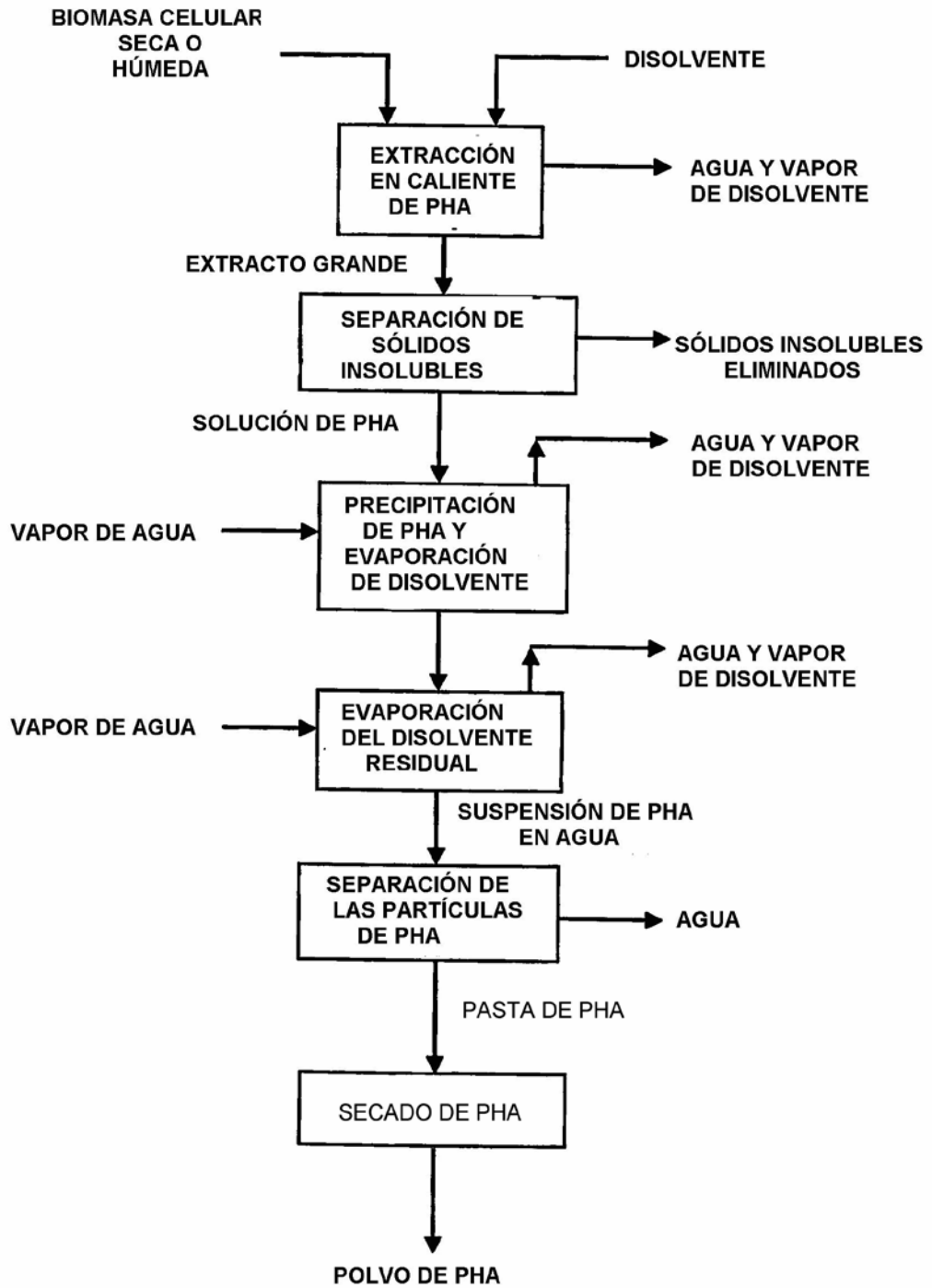


FIG.1