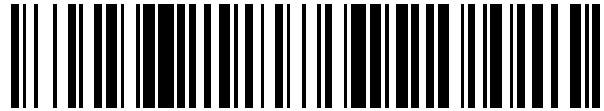


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 437 340**

51 Int. Cl.:

**C12P 7/62**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.10.2009 E 09748848 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.08.2013 EP 2488653**

54 Título: **Utilización de partículas celulares generadas a partir de la recuperación de PHA para crecimiento celular mejorado**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**10.01.2014**

73 Titular/es:

**BIO ON S.R.L. (50.0%)  
Via Dante Alighieri 7/B  
40016 San Giorgio Di Piano (Bologna), IT y  
CO.PRO.B. COOPERATIVA PRODUTTORI  
BIETICOLI SOC. COOP. AGRICOLA (50.0%)**

72 Inventor/es:

**YU, JIAN**

74 Agente/Representante:

**CURELL AGUILÁ, Mireia**

**ES 2 437 340 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

Utilización de partículas celulares generadas a partir de la recuperación de PHA para crecimiento celular mejorado.

5 **Antecedentes de la invención**

La presente invención se refiere a un procedimiento para producir materiales poliméricos biodegradables a partir de una fuente de carbono orgánico, por ejemplo melaza y pulpa de remolacha azucarera. Particularmente, la presente invención se refiere a un procedimiento para producir materiales poliméricos biodegradables incluyendo polihidroxicanoatos con partículas celulares, un tipo de desecho orgánico que queda de la recuperación y purificación de polihidroxicanoatos de células.

Los polihidroxicanoatos (PHA) son homopolímeros o copolímeros de hidroxicanoatos, tales como 3-hidroxi butirato (3HB), 3-hidroxi valerato (3HV), 4-hidroxi valerato (4HV) y 3-hidroxi hexanoato (3HH). Estos biopolímeros termoplásticos o elásticos se sintetizan y acumulan por muchos microorganismos, bacterias en particular, como materiales de almacenamiento de carbono y energía. Los PHA se sintetizan convenientemente cultivando las células microbianas en un medio acuoso con una fuente de carbono, incluyendo azúcares, ácidos orgánicos y alcoholes. Dependiendo de las cepas y las condiciones de crecimiento, los biopolímeros en forma de pequeños gránulos (0,3-0,5  $\mu$ m) pueden representar el 50-80% en peso de la masa celular seca.

Los gránulos de PHA deben separarse del resto de la masa celular que no es PHA de modo que los bioplásticos presenten la propiedad material y pureza deseadas. Las partículas celulares residuales de la recuperación de PHA, que consisten en proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y fragmentos de pared, no presentan valor comercial y o bien se desechan como desecho sólido o bien se descargan en el agua residual de procedimiento.

Habitualmente se utilizan dos tecnologías para la recuperación de PHA, basadas o bien en extracción con disolvente orgánico de poliésteres o bien en digestión de la masa celular que no es PHA. En la primera, los gránulos de PHA se disuelven en disolventes orgánicos apropiados, quedando sólidos de partículas celulares. En la segunda, quedan gránulos de PHA como sólidos, pero la masa celular que no es PHA se digiere y se disuelve en disoluciones acuosas con ayuda de agentes biológicos y químicos. Una separación sólido/líquido convencional después de los tratamientos genera una corriente de producto de PHA y otra corriente de partículas celulares que no son PHA. Según la composición celular, las partículas celulares son realmente la verdadera masa celular que contiene todos los componentes esenciales del crecimiento celular, mientras que el PHA de producto sólo es un material de reserva de carbono. Con el fin de producir poliésteres de PHA, deben consumirse suficientes nutrientes (C, N, P, minerales y factores de crecimiento orgánicos) para hacer crecer suficientes células que a su vez sintetizan biopolímeros a partir de la fuente de carbono.

La patente U.S. n° 7.514.525 se refiere a un procedimiento para recuperar, purificar y aislar biopolímeros de PHA a partir de una masa celular que contiene PHA, que incluye: (a) solubilizar la masa celular que no es PHA en una disolución ácida, quedando una suspensión de gránulos de PHA parcialmente cristalizados; (b) ajustar el pH de la suspensión a 7-11 y separar los sólidos de PHA de la masa celular que no es PHA disuelta; (c) resuspender los sólidos de PHA en una disolución de blanqueamiento para su decoloración; y (d) secar los sólidos de PHA resultantes. Se recupera aproximadamente el 95% o más del PHA original en la masa celular, y la pureza de los sólidos de PHA es de aproximadamente el 97% o superior.

45 **Sumario de la invención.**

El solicitante se ha enfrentado al problema de mejorar el rendimiento de un procedimiento para producir PHA a partir de una fuente de carbono orgánico mediante fermentación microbiana. El solicitante también se ha enfrentado al problema de deshacerse de las partículas celulares que quedan de la recuperación y purificación de PHA. El solicitante ha encontrado que los problemas anteriores pueden solucionarse utilizando las partículas celulares obtenidas tras solubilizar la masa celular que no es PHA para suministrar adicionalmente los microorganismos que producen PHA. La reutilización de las partículas celulares anteriores como nutrientes aumenta notablemente los rendimientos de crecimiento celular y síntesis de PHA sobre sustratos carbonosos tales como glucosa, fructosa y sacarosa, puesto que pueden asimilarse fácilmente por las células microbianas.

Por tanto, según un primer aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para producir materiales poliméricos biodegradables incluyendo polihidroxicanoatos (PHA) a partir de una fuente de carbono orgánico, que comprende:

- 60 (a) cultivar células microbianas que producen PHA en una disolución de medio que contiene una fuente de carbono orgánico para formar PHA que se acumulan en las células como cuerpos de inclusión;
- 65 (b) recoger las células del medio gastado y solubilizar la masa celular que no es PHA para obtener un sólido de PHA y una disolución de partículas celulares;

- (c) separar el sólido de PHA de la disolución de partículas celulares;
- (d) suministrar la disolución de partículas celulares a la etapa de cultivo (a).

## 5 Descripción detallada de la invención.

Con "fuente de carbono orgánico" quiere decirse cualquier compuesto orgánico o mezclas de los mismos que pueden metabolizarse por células microbianas que producen PHA, tales como glucosa, fructosa, sacarosa o hidratos de carbono similares o cualquier mezcla orgánica de hidratos de carbono tales como pulpa de remolacha azucarera, melaza de remolacha azucarera, melaza de caña de azúcar. La disolución de medio, además de la fuente de carbono orgánico, puede contener factores de crecimiento orgánicos adicionales, N, P y/u otros minerales tales como nutrientes para el crecimiento celular.

Según una realización preferida, la etapa de solubilización (b) se lleva a cabo:

- (b1) solubilizando la masa celular que no es PHA en una disolución ácida para obtener una primera suspensión de un sólido de PHA en una disolución ácida de partículas celulares;
- (b2) ajustando el pH de la primera suspensión a un valor de 7 a 11 para obtener una segunda suspensión del sólido de PHA en una disolución básica de partículas celulares.

Según la realización preferida anterior, las células que contienen gránulos de PHA se tratan en primer lugar en una disolución ácida que libera una parte sustancial de las proteínas (partículas celulares ácidas). Al mismo tiempo, los gránulos de PHA se cristalizan parcialmente a partir de la estructura lábil original, lo que hace que los poliésteres sean duros y resistentes a la digestión química. El tratamiento ácido puede llevarse a cabo añadiendo una disolución acuosa de un ácido fuerte, tal como ácido sulfúrico. Preferiblemente, la disolución acuosa de un ácido fuerte se añade a la masa celular que no es PHA en una cantidad como para lograr una concentración de iones de hidrógeno ( $H^+$ ) comprendida entre 0,01 y 0,5 moles/l. La etapa de solubilización (b1) se lleva a cabo preferiblemente a una temperatura comprendida entre 80° y 130°C, durante un período de tiempo comprendido entre 0,5 y 5 horas.

Tras la separación de la disolución ácida, las células con gránulos de PHA se tratan adicionalmente en una disolución básica para disolver el resto de la masa celular que no es PHA. Preferiblemente, la disolución básica es una disolución acuosa de al menos una base fuerte, tal como hidróxido de sodio o hidróxido de potasio.

El tratamiento alcalino puede ayudarse añadiendo al menos un tensioactivo, preferiblemente al menos un tensioactivo iónico, preferiblemente un sulfato de alquilo  $C_6-C_{18}$ , tal como dodecilsulfato de sodio (SDS). El al menos un tensioactivo promueve la alteración celular y la descomposición de la membrana. El al menos un tensioactivo se añade preferiblemente en una cantidad comprendida entre 2 y 10 g/l, preferentemente entre 4 y 7 g/l.

El tratamiento de dos etapas anterior digiere y disuelve la mayoría de la masa celular que no es PHA mientras que se pierde poco PHA. Igualmente importante, los tratamientos pueden convertir las partículas celulares en formas apropiadas que pueden asimilarse directamente por las células microbianas como nutrientes para el crecimiento y la formación de PHA.

Pueden generarse tres tipos de disoluciones de partículas celulares en la recuperación de PHA como desechos acuosos:

1. Disolución ácida de partículas celulares (ACDS) que contiene proteínas y otros compuestos biológicos solubles liberados de las células en disolución ácida.
2. Disolución básica de partículas celulares (BCDS), que incluye opcionalmente al menos un tensioactivo, que contiene aminoácidos, ácidos grasos y otros componentes celulares digeridos derivados de las partículas celulares tratados con ácido en condiciones alcalinas.
3. Disolución ácido-base de partículas celulares (ABCDS), que incluye opcionalmente al menos un tensioactivo, que contiene aminoácidos, ácidos grasos, péptidos y otros componentes celulares digeridos en condiciones tanto ácidas como básicas. Esta disolución de desecho acuoso se genera cuando los tratamientos con ácido y con base secuenciales se realizan sin separación celular.

Según la presente invención, estos tres tipos de partículas celulares pueden reutilizarse como nutrientes en la producción microbiana de biopolíester de PHA.

Por tanto, según una primera realización preferida, en el procedimiento de la presente invención, se lleva a cabo una etapa de separación (c1) en la primera suspensión y la disolución ácida de partículas celulares resultante se suministra según la etapa (d).

Según una segunda realización preferida, en el procedimiento de la presente invención, se lleva a cabo una etapa de separación (c2) en la segunda suspensión y la disolución básica de partículas celulares resultante se suministra según la etapa (d).

5 Preferiblemente, tanto la etapa de separación (c1) como la etapa de separación (c2) se llevan a cabo en la primera suspensión y en la segunda suspensión respectivamente, y las disoluciones de partículas celulares resultantes se suministran según la etapa (d).

10 Según una tercera realización preferida, en el procedimiento de la presente invención, se lleva a cabo una etapa de separación (c3) sólo en la segunda suspensión y la disolución ácido-base de partículas celulares resultante se suministra según la etapa (d).

15 Preferiblemente, la cantidad total de partículas celulares que se suministra conjuntamente con la fuente de carbono orgánico a la etapa de cultivo (a) está comprendida entre el 5 y el 50% en peso, preferentemente entre el 10 y el 40% en peso, con respecto al peso del sustrato de carbono equivalente a glucosa. Con "peso del sustrato de carbono equivalente a glucosa" quiere decirse la cantidad de la fuente orgánica de carbono expresada por la cantidad correspondiente de glucosa como sustrato para la fermentación microbiana.

20 En el caso de la disolución ácida de partículas celulares (ACDS) suministrada a la etapa (a), la cantidad de partículas celulares está comprendida preferentemente entre el 5 y el 20% en peso con respecto al peso del sustrato de carbono equivalente a glucosa. De hecho, se ha observado un efecto de inhibición por la ACDS sobre el crecimiento celular y la formación de PHA cuando la cantidad anterior es superior al 20% en peso. Un efecto de este tipo no se ha observado cuando se suministra la BCDS o la ABCDS.

25 El sólido de PHA obtenido a partir de la etapa de separación (c) puede someterse a tratamientos adicionales, tales como decoloración, lavado y/o secado para lograr la calidad y pureza de producto deseadas según técnicas conocidas, tales como las notificadas en la patente US n° 7.514.525 mencionada anteriormente.

30 Los siguientes ejemplos de trabajo se facilitan para ilustrar mejor la invención, pero sin limitar su alcance.

#### Disoluciones de partículas celulares.

35 Tras la fermentación de PHA, se recogieron las células que contienen gránulos de PHA del medio con centrifugación a 5000 g durante 10 min. Los sedimentos celulares húmedos presentaban una densidad de 450-500 g de masa seca/l dependiendo del volumen del medio, la fuerza y el tiempo de centrifugación. Se recuperaron PHA y se purificaron de las células eliminando la masa celular que no es PHA (aproximadamente el 30% p/p) en tres etapas: (1) pretratamiento con ácido, (2) tratamiento con base, (3) decoloración con hipoclorito y (4) lavado y secado. Se detallan tal como sigue.

40 (1) Pretratamiento con ácido: Se resuspendieron los sedimentos celulares húmedos del caldo de fermentación en un volumen equivalente de disolución acuosa de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,2 M. Se calentó la suspensión espesa de 200-250 g de materia seca/l hasta ebullición y entonces se mantuvo durante una hora en condiciones ambientales. Tras enfriar hasta temperatura ambiente, se separaron los sedimentos pretratados con ácido de la disolución ácida con centrifugación a 5000 g durante 10 min. El sobrenadante limpio presentaba un color parduzco y un contenido en sólidos de entre 35-65 g/l dependiendo de la densidad de suspensión espesa y las condiciones de tratamiento. Después de esto, se denomina disolución ácida de partículas celulares (ACDS).

45 (2) Tratamiento con base: Se resuspendieron los sedimentos celulares húmedos del pretratamiento con ácido en un volumen equivalente de agua que se ajustó previamente a pH de 10,2 a 10,5 con disolución de NaOH 5 M. Se añadió una pequeña cantidad de tensioactivos tales como dodecilsulfato de sodio (SDS, CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>OSO<sub>3</sub>Na) hasta una concentración de 5 g/l y se agitó la suspensión espesa en condiciones ambientales durante 30 min. Se calentó hasta ebullición y se mantuvo en condiciones ambientales durante 10 min. Se separaron las células/PHA tratados de un sobrenadante oscuro tras centrifugación a 5000 g durante 15 min. La disolución de sobrenadante presentaba un contenido en sólidos de 30 a 60 g de materia seca/l y después de esto se denomina disolución básica de partículas celulares (BCDS).

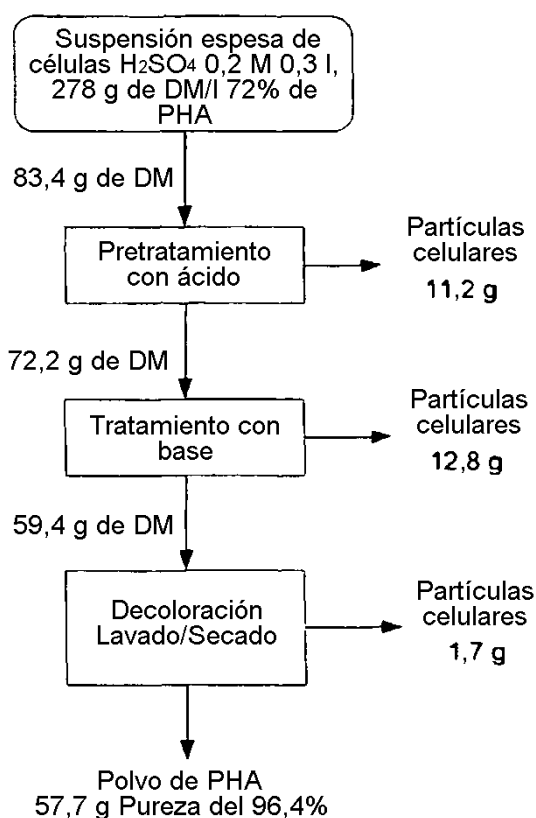
50 (3) Los tratamientos con ácido y base secuenciales anteriores también podrían realizarse sin separación de células después del tratamiento con ácido. Se añadieron directamente una base tal como hidróxido de sodio y un tensioactivo tal como SDS a la suspensión espesa ácida de células y se elevó el pH hasta 10-10,5 para el tratamiento con base. Se generó una disolución ácido-base de partículas celulares, denominada después de esto ABCDS, con separación sólido/líquido tras el tratamiento con base. Los desechos acuosos contenían dos tipos de partículas celulares disueltas en los tratamientos con ácido y base secuenciales.

55 (4) Decoloración con hipoclorito: Se resuspendieron los sedimentos húmedos del tratamiento con base en una disolución de blanqueamiento disponible comercialmente que contenía el 6% p/p de hipoclorito. El volumen de la disolución de blanqueamiento se estimó basándose en 1 parte de hipoclorito por 1 parte de sólido seco que contenía

PHA. La cantidad de sólido de PHA se estimó a partir de la masa húmeda y su contenido en sólidos secos del 60% p/p. Se agitó la suspensión espesa durante 2 horas en condiciones ambientales. Se recuperaron unos sedimentos de PHA de color blanco tras la centrifugación a 5000 g durante 20-30 min. La disolución de sobrenadante que contenía hipoclorito residual se reutilizó para el blanqueamiento tras añadirse hipoclorito nuevo.

5 (5) Lavado y secado: Los sólidos de PHA de color blanco húmedos del blanqueamiento se lavaron con agua dos veces y se secaron en un horno a 80°C. El producto de PHA final era un polvo de color blanco.

10 El siguiente esquema muestra un ejemplo de recuperación y purificación de PHA y descarga de disoluciones ácidas y básicas de partículas celulares. Comenzó con 0,3 l de suspensión espesa de células que contenía 83,4 g de masa celular seca (DM) con un contenido en PHA del 72% p/p. Tras el tratamiento con eliminación de partículas celulares, el polvo de PHA final contenía el 96,4% de PHA.



15 Tras el pretratamiento con ácido, se recuperaron 72,2 g de sólido seco y se disolvieron 11,2 g de partículas celulares en disolución ácida y se descargaron. Con tratamiento con base y SDS, se recuperaron 59,4 g de sólido seco y se disolvieron 12,8 g de partículas celulares en disolución básica y se descargaron. Se perdió una pequeña cantidad de polímeros de PHA en partículas celulares debido a pérdida por separación. Las partículas celulares descargadas de los tratamientos con ácido y base representaban más del 90% en peso de las partículas celulares totales descargadas del procedimiento de recuperación y purificación de PHA.

#### Utilización de partículas celulares en fermentación de PHA.

25 En la recuperación de PHA tal como se mostró anteriormente, se descompuso la masa celular que no es PHA que incluye proteínas, ácidos nucleicos, lípidos de membrana y fragmentos de pared celular en partículas celulares que se disolvieron como sólidos solubles en disoluciones acuosas.

30 Comenzando con masa celular de contenido en PHA alto (72% p/p), la producción de 1 kg de PHA, con una pureza de 96,4 p/p, genera aproximadamente 0,45 kg de partículas celulares tal como se muestra en el esquema notificado anteriormente. Deshacerse de esta gran cantidad de desecho en disolución acuosa es una tarea muy costosa, pero podría evitarse con beneficio adicional si las partículas celulares pudieran reutilizarse en la fermentación de PHA. Con el fin de revelar el efecto de las partículas celulares sobre el crecimiento celular y la formación de PHA, se realizaron cultivos microbianos en matraces de 500 ml en paralelo. Se establecieron los cultivos de los matraces con las mismas concentraciones de glucosa (10-20 g/l), el mismo volumen de disolución mineral (160 ml) tal como se muestra en la tabla 1 notificada a continuación en la presente memoria, y el mismo inóculo y tamaño. Tras añadirse una cantidad predeterminada de disoluciones de partículas celulares, se elevó el volumen total de los cultivos de los

matraces hasta 200 ml añadiendo agua destilada y desionizada destilada previamente. Se agitaron los matraces a 200 rpm y 30°C en una incubadora giratoria durante 24 o 48 horas. Se determinaron la concentración de la masa celular y el contenido en PHA tal como se describe en la bibliografía (véase Jian Yu y Lilian X. L. Chen (2006), "Cost-effective recovery and purification of polyhydroxyalkanoates by selective dissolution of cell mass", *Biotechnology Progress*, 22:547-553).

TABLA 1 Disoluciones minerales para el crecimiento celular y la síntesis de PHA

Medio mineral(a)	Concentración (g/l)	Disolución traza (b)	Concentración (g/l)
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2	citrato de Fe(NH <sub>4</sub> )	50
K <sub>2</sub> BPO <sub>4</sub>	2,8	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	7,8
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,5	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,5
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1	MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0,1
Disolución traza (b)	1 ml	CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,05
		Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,15
		H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1,5
		CoSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1,1
		NiCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,1

(a) La disolución mineral se somete a autoclave a 121°C durante 10 min.  
 (b) La disolución traza se prepara en HCl 0,1 N y se añade directamente, sin esterilización, en el medio mineral sometido a autoclave

10 Caso 1. Utilización de disolución ácida de partículas celulares (ACDS)

Se utilizó una disolución ácida de partículas celulares que contenía 38 g/l de sólidos solubles en este experimento. Se añadió una cantidad predeterminada de ACDS a los matraces para dar una razón diferente de partículas celulares con respecto a glucosa al 0, 10, 20 y 25% de azúcar, respectivamente. Se ejecutaron duplicados sin partículas celulares en paralelo como controles experimentales. Tal como se muestra en la figura 2, las partículas celulares son claramente beneficiosas para el crecimiento celular y la síntesis de PHA. Los beneficios son estadísticamente significativos en comparación con dos controles. En primer lugar, las partículas celulares conducen a una velocidad de crecimiento celular más rápida que los controles en las primeras 24 horas. En segundo lugar, las partículas celulares también pueden utilizarse como fuente de carbono extra que genera más células que los controles en 48 horas. En tercer lugar, las partículas celulares presentan el mismo efecto positivo sobre la síntesis de PHA. En cuarto lugar, existe una razón óptima de partículas celulares con respecto a glucosa (el 10% p/p en este caso). Demasiadas partículas celulares podrían inhibir el crecimiento celular y la formación de PHA tal como se muestra en la figura 2.

En esta demostración, el rendimiento de crecimiento celular global (Y<sub>x</sub>/s) y el rendimiento de la formación de PHA (Y<sub>p</sub>/s) se calculan a partir de las cantidades de masa celular y PHA formadas y la cantidad de azúcar añadida inicialmente, independientemente de la cantidad de azúcar no utilizada. Los beneficios de la reutilización de partículas celulares en la fermentación de PHA son claros y sustanciales cuando se comparan los rendimientos con los de los controles tal como se muestra en la tabla 2. Las diferencias de los rendimientos relativos son estadísticamente significativas. En términos generales, a la dosificación de partículas celulares de alrededor del 10% p/p de azúcar, el crecimiento celular presentaba un aumento del 40-50% y la formación de PHA presentaba un aumento del 45-65% p/p en comparación con los controles. Los rendimientos son relativos con respecto a los controles sin adición de partículas celulares.

35 TABLA 2. Efectos de partículas celulares ácidas sobre los rendimientos de formación de PHA y masa celular

Partículas celulares/azúcar (% p/p)	Y <sub>x</sub> /s (g de células/g de azúcar)		Y <sub>p</sub> /s (g de PHA/g de azúcar)	
	24 h	48 h	24 h	48 h
0	1,00 ± 0,06	1,00 ± 0,05	1,00 ± 0,1	1,00 ± 0,02
10	1,54	1,43	1,67	1,46
20	1,60	1,29	1,63	1,20
25	1,34	1,29	1,14	1,07

40 Caso 2. Utilización de la disolución ácido-base de partículas celulares (ABCDS)

En los mismos cultivos de matraces anteriores, se añadió una disolución ácido-base de partículas celulares (48,5 g/l de sólidos solubles) para dar razones diferentes de partículas celulares con respecto a glucosa (el 0-40% en peso) tal como se muestra en la tabla 3. En comparación con los controles sin partículas celulares añadidas, las concentraciones de tanto la masa celular como el contenido en PHA aumentaron sustancialmente. Los rendimientos relativos aumentaron en un 100 - 300%. No se observó ningún efecto inhibitorio de las partículas celulares ácidas-básicas, probablemente debido a la digestión de los inhibidores en el tratamiento alcalino.

TABLA 3. Efecto de partículas celulares ácidas-básicas sobre el crecimiento celular y la formación de PHA en 48 horas.

Partículas celulares (g/l)	Partículas/azúcar (% en peso)	Masa celular (g/l)	PHA (% en peso)	PHA (g/l)	Yx/s	Yp/s
0,0	0	2,1	45	0,95	1,0	1,0
1,15	9,4	4	55	2,2	1,8	2,25
2,30	18,8	4,5	60	2,7	2,1	2,75
4,60	38,8	5,6	61	3,4	2,6	3,50

5 Caso 3. Comparación de los tres tipos de partículas celulares como nutrientes de crecimiento

10 En los mismos cultivos de matraces anteriores, se añadieron tres tipos de disoluciones de partículas celulares (ACDS, BCDS y ABCDS) a diferentes concentraciones de partículas celulares. Se comparan las concentraciones de masa celular en relación con los controles sin partículas celulares tras 48 horas de cultivo tal como se muestra en la figura 2. El aumento celular relativo célula notificado en la figura 2 es la razón de una concentración de masa celular con respecto al control. El efecto nutricional de ACDS y BCDS sobre el crecimiento celular es muy similar, mientras que ABCDS presenta un mejor valor de nutrientes que ACDS y BCDS.

15 Caso 4. Efecto del tensioactivo en partículas celulares

20 Se utilizan opcionalmente tensioactivos tales como SDS en la recuperación de PHA para alterar las células y eliminar lípidos y pigmentos de los poliésteres. Son solubles y quedan en las disoluciones de partículas celulares, lo que puede provocar un efecto adverso sobre el crecimiento celular cuando se reutiliza la disolución de partículas celulares en la fermentación de PHA. Se utilizó en este caso una disolución ácido-base de partículas celulares que contenía 48,5 g/l de sólidos solubles y 5 g/l de SDS. En los mismo cultivos de matraces anteriores (12 g/l de glucosa), se añadieron 8 ml de ABCDS para dar 1,94 g/l de partículas celulares y 0,2 g/l de SDS. También se añadió SDS adicional para aumentar la concentración de SDS hasta 0,4, 0,6 y 0,8 g/l. La tabla 4 facilita los resultados del crecimiento celular y la formación de PHA a diferentes niveles de tensioactivo. En comparación con el control sin partículas celulares y tensioactivo, todos los matraces con partículas celulares muestran beneficios para el crecimiento celular. La formación de PHA también se potencia a concentraciones de tensioactivo de bajas a moderadas (0,2-0,6 g/l), pero se perjudica en un alto grado a la concentración de SDS alta (0,8 g/l). El beneficio de las partículas celulares a concentración de SDS baja (0,2-0,4 g/l) conduce a un 200-300% de aumento en la concentración de PHA en comparación con el control.

30 TABLA 4. Efecto del tensioactivo SDS sobre el crecimiento celular y la formación de PHA

Partículas celulares (g/l)	SDS (g/l)	24 horas			48 horas		
		Masa celular (g/l)	PHA (% en peso)	PHA (g/l)	Masa celular (g/l)	PHA (% en peso)	PHA (g/l)
0	0	2,08	36,8	0,77	2,7	44,4	1,20
1,94	0,2	3,69	49,7	1,83	4,99	60,6	3,02
1,94	0,4	3,33	43,7	1,45	4,62	57,0	2,63
1,94	0,4	3,22	39,6	1,27	4,46	53,8	2,40
1,94	0,6	2,70	33,9	0,92	3,51	50,3	1,77
1,94	0,8	2,59	17,8	0,46	3,54	25,8	0,91

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Procedimiento para producir materiales poliméricos biodegradables incluyendo polihidroxialcanoatos (PHA) a partir de una fuente de carbono orgánico, que comprende:
- 10 (a) cultivar células microbianas que producen PHA en una disolución de medio que contiene una fuente de carbono orgánico para formar PHA que se acumulan en las células como cuerpos de inclusión;
- (b) recoger las células a partir del medio gastado y solubilizar la masa celular que no es PHA para obtener un sólido de PHA y una disolución de partículas celulares;
- 15 (c) separar el sólido de PHA de la disolución de partículas celulares;
- (d) suministrar la disolución de partículas celulares a la etapa (a) de cultivo.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la etapa (b) de solubilización se lleva a cabo:
- (b1) solubilizando la masa celular que no es PHA en una disolución ácida para obtener una primera suspensión de un sólido de PHA en una disolución ácida de partículas celulares;
- 20 (b2) ajustando el pH de la primera suspensión a un valor comprendido entre 7 y 11 para obtener una segunda suspensión del sólido de PHA en una disolución básica de partículas celulares.
3. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que se lleva a cabo una etapa de separación (c1) en la primera suspensión y la disolución ácida de partículas celulares resultante se suministra según la etapa (d).
- 25 4. Procedimiento según la reivindicación 3, en el que se lleva a cabo una etapa de separación (c2) en la segunda suspensión y la disolución básica de partículas celulares resultante se suministra según la etapa (d).
- 30 5. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que se lleva a cabo una etapa de separación (c3) en la segunda suspensión y la disolución ácido-base de partículas celulares resultante se suministra según la etapa (d).
6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la cantidad total de partículas celulares suministrada a la etapa de cultivo (a) está comprendida entre el 5 y el 50% en peso con respecto a la cantidad del sustrato de carbono equivalente a glucosa.
- 35 7. Procedimiento según la reivindicación 3, en el que la cantidad de la disolución ácida de partículas celulares (ACDS) suministrada a la etapa (b) está comprendida entre el 5 y el 20% en peso con respecto al peso del sustrato de carbono equivalente a glucosa.
- 40 8. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que la etapa de ajuste (b2) comprende añadir al menos un tensioactivo a la primera suspensión.
- 45 9. Procedimiento según la reivindicación 8, en el que el al menos un tensioactivo es un tensioactivo iónico.
10. Procedimiento según la reivindicación 8 o 9, en el que el al menos un tensioactivo se añade en una cantidad comprendida entre 2 y 10 g/l.
- 50 11. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones desde 2 hasta 10, en el que la etapa de solubilización (b1) comprende añadir una disolución acuosa de un ácido fuerte a la masa celular que no es PHA.
12. Procedimiento según la reivindicación 11, en el que se añade la disolución acuosa de un ácido fuerte a la masa celular que no es PHA en una cantidad suficiente para lograr una concentración de iones de hidrógeno (H<sup>+</sup>) comprendida entre 0,01 y 0,5 moles/l.
- 55 13. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones desde 2 hasta 12, en el que la etapa de solubilización (b1) se lleva a cabo a una temperatura comprendida entre 80° y 130°C, durante un periodo de tiempo comprendido entre 0,5 y 5 horas.
- 60 14. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 13, en el que la etapa de ajuste (b2) comprende añadir una disolución acuosa de al menos una base fuerte a la primera suspensión.



FIG. 1a

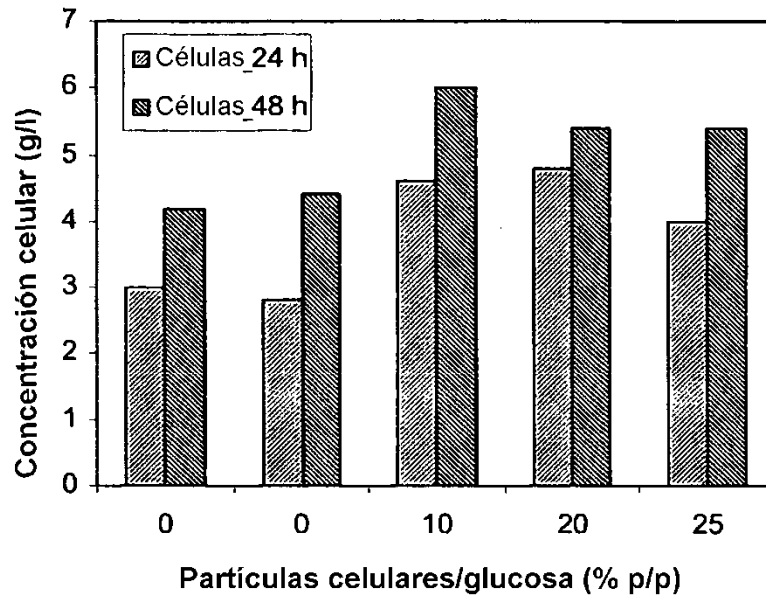


FIG. 1b

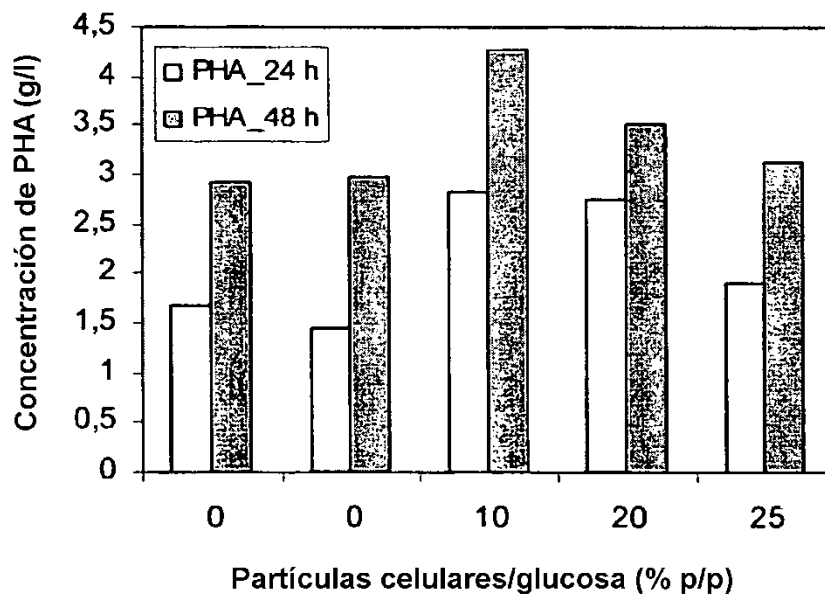


FIG. 2

