

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 606 779**

51 Int. Cl.:

C12P 7/62 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.11.2011 PCT/IB2011/055164**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.05.2013 WO13072723**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.11.2011 E 11802533 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.09.2016 EP 2780461**

54 Título: **Procedimiento enzimático para producir copolímeros de hidroxialcanoato usando dos materias primas diferentes**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.03.2017

73 Titular/es:
**BIO-ON S.P.A. (100.0%)
Via Dante Alighieri 7/B
40016 San Giorgio Di Piano, Bologna, IT**

72 Inventor/es:
YU, JIAN

74 Agente/Representante:
DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 606 779 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

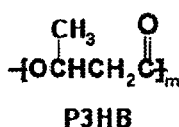
Procedimiento enzimático para producir copolímeros de hidroxialcanoato usando dos materias primas diferentes

La presente invención se refiere a un procedimiento para producir copoliésteres microbianos, particularmente copolímeros microbianos de hidroxialcanoato, a partir de dos materias primas diferentes que contienen sacarosa.

5 **Antecedentes de la invención**

Los polihidroxialcanoatos (PHAs) son una familia de biopoliésteres sintetizados y acumulados en las células bacterianas como almacenamiento de carbono y energía. Los biopoliésteres pueden ser fundidos y moldeados como los plásticos convencionales, pero se biodegradan completamente en el medio ambiente. Dado que los bioplásticos de PHA se producen a partir de materias primas renovables, su consumo de energía fósil y emisiones de gases de invernadero son mucho más bajos que los de sus homólogos basados en petróleo.

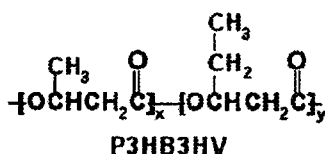
El poli-(3-hidroxitirato), identificado habitualmente como P3HB o PHB, es el PHA más común formado por microorganismos a partir de carbohidratos, y puede representarse por la siguiente fórmula:



La formación de otros PHAs necesita a menudo precursores o sustratos relacionados estructuralmente. Los monómeros de hidroxialcanoato generados por el metabolismo en especies microbianas nativas son habitualmente 3-hidroxialcanoatos (3HAs) en configuración R, debido a la estereoespecificidad de las enzimas en la biosíntesis de PHAs.

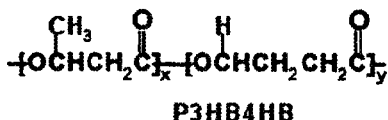
Debido a la alta estereorregularidad, los biopoliésteres exhiben algunas propiedades únicas, tales como actividad óptica, biodegradabilidad y alta cristalinidad de algunos polímeros PHA. Por ejemplo, P3HB tiene una alta cristalinidad de hasta 70%, dando como resultado un material rígido con alta temperatura de fusión (180 °C), alto módulo elástico (3,5 GPa), alta resistencia a la tracción (43 MPa), pero bajo alargamiento a la rotura (5%). Por lo tanto tiene aplicaciones limitadas.

La ductilidad del P3HB puede ser mejorada introduciendo grupos laterales grandes, tales como grupos etilo, sobre la cadena principal del poliéster, para formar un copoliéster, poli(3-hidroxitirato-co-3-hidroxitirato), identificado habitualmente como P3HB3HV o PHBV, que tiene la fórmula:



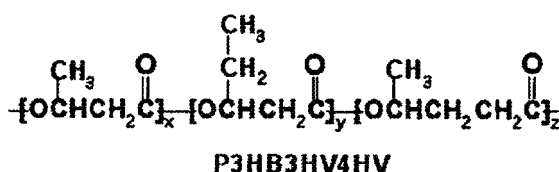
Comparado con el PHB, un copoliéster PHBV (HB:BV=90:10) tiene una cristalinidad más baja (60%), punto de fusión más bajo (140 °C), módulo elástico más bajo (0,8 GPa), resistencia a la tracción más baja (20 MPa), pero alargamiento a la rotura más alto (50%). Los monómeros 3HV, sin embargo, pueden incorporarse en el retículo cristalino del P3HB, un fenómeno llamado isodimorfismo, que reduce la función del grupo etilo (véase p.ej. el artículo de P.J. Barham, P. Barker, S.J. Organ, FEMS Microbiol. Lett. 103: 289-298 (1992)).

Incorporando un monómero largo, tal como 4-hidroxitirato (4HB), en la cadena principal del PHA, la cristalinidad también puede ser reducida, y por tanto las propiedades del material pueden ser modificadas. Por ejemplo, un copoliéster, P3HB4HB (3HB:4HB=84:16), que tiene la fórmula:



tiene una cristalinidad de 45%, una resistencia a la tracción de 26 MPa, y un alargamiento a la rotura de 400% (véase el artículo de Z. Zhu, P. Dakwa, P. Tapadia, R.W. Whitehouse, S.Q. Wang, Macromolecules 36: 4891-4897. (2003)). El monómero largo parece muy eficaz en mejorar la ductilidad de los copoliésteres. Un alto contenido de 4HB, sin embargo, da como resultado resistencia a la tracción baja y cristalización lenta.

Un terpoliéster, poli(3-hidroxitirato-co-3-hidroxitirato-co-4-hidroxitirato) (3HB:3HV:4HV=0,8:69,2:30) - identificado habitualmente como P3HB3HV4HV o PHBVV - que tiene la fórmula:



se sintetizó a partir de ácido 4-cetovalérico usando la bacteria *P. putida* GPp1O4. El terpoliéster se solidifica muy lentamente desde el estado fundido, lo que puede plantear un gran desafío al procesamiento térmico y fabricación del bioplástico (véase el artículo de V. Gorenflo, G. Schmack, R. Vogel y A. Steinbuechel, *Biomacromolecules*, 2: 45-57 (2001)).

En la biosíntesis microbiana de PHA, los monómeros de 3HV, 4HB y 4HV se derivan a menudo de precursores o sustancias químicas relacionadas estructuralmente, tales como ácido propiónico, 1,4-butanodiol y ácido 4-cetovalérico, bien como única fuente de carbono o bien como un cosustrato con fuentes de carbono comunes tales como glucosa. Los precursores, sin embargo, son a menudo mucho más caros que la glucosa o los carbohidratos, contribuyendo notablemente así a altos costes de producción de los bioplásticos PHA. *Ralstonia eutropha* es un productor de PHA representativo, y puede acumular polímeros PHA hasta 70-80% en peso de la masa celular. Este aerobio gram-negativo no esporulante crece sobre fuentes de carbono simples y sales minerales. En presencia de glucosa y ácido propiónico o ácido valérico, *R. eutropha* sintetiza copolímeros P3HB3HV con un contenido de 3HV de 5 a 25% en moles. Debido a la relativamente ineficaz incorporación de los ácidos orgánicos en la cadena principal del PHA, se mantiene a menudo una alta concentración de ácido en el medio de cultivo, dando como resultado una alta toxicidad para las células.

En la patente de EE.UU. N° 5.364.778 se describe una posible solución al problema anterior, en donde se describe un procedimiento microbiológico para producir copolímeros que comprenden unidades monoméricas HB y HV usando una bacteria acumuladora de PHB que no es capaz de crecer significativamente cuando se cultiva bajo condiciones no limitantes del crecimiento sobre un sustrato que consiste esencialmente en un componente de HV. Por lo tanto, al menos parte del cultivo se realiza bajo condiciones limitantes del crecimiento, es decir, bajo condiciones en donde estaría limitado un requisito esencial para el crecimiento pero no la acumulación de copolímero. Bajo tales condiciones de limitación del crecimiento, la tendencia de la bacteria a producir y acumular homopolímero PHB sería evitada, y la producción y acumulación de copolímero que contiene HV sería inducida.

En Matt Jaremko y Jian Yu (*Journal of Biotechnology*, julio de 2011, páginas 113-122), se describe la bioconversión de ácido levulínico con enzimas brutas de *Cupriavidus necator*, mostrando la evidencia directa de formación de acetil-CoA y propionil-CoA a partir de ácido levulínico. Los resultados del estudio revelaron además los intermediarios metabólicos iniciales mediante los cuales *C. necator* sintetiza un copolímero PHA que consiste principalmente en monómeros 3HB y 3HV.

Jian Yu et al. (*J. Biobased Materials and Energy*, 2009, págs. 113-122) describe la síntesis de biopoliéster y regulaciones de proteínas en *Ralstonia eutropha* sobre el ácido levulínico y sus derivados a partir de refinado de biomasa, con referencia particular a la conversión del ácido levulínico y la biosíntesis a polihidroxicanoatos.

Jian Yu et al. (*Bioresource Technology*, 2008, págs. 8042-8048) describe el uso de hidrolizado de bagazo por *Ralstonia eutropha*.

Jian Yu et al. (*Green Polymer Chemistry*, 2010, págs. 161-173) describe el uso de ácido 4-cetovalérico por una cepa tolerante de *Ralstonia eutropha*.

Compendio de la invención

El Solicitante se ha enfrentado al problema de producir poliésteres biodegradables que tienen una combinación de resistencia material y ductilidad para hacerlos adecuados para un amplio intervalo de aplicaciones. El Solicitante ha centrado sus esfuerzos en copolímeros de hidroxialcanoato, y particularmente en terpolímeros PHBVV, cuya producción por fermentación microbiana, como se explicó anteriormente, muestra muchos inconvenientes, debido principalmente al alto coste de los precursores orgánicos para los monómeros 3HV y 4HV, la incorporación ineficaz de monómeros HV en la cadena principal del poliéster, a la toxicidad de los precursores orgánicos para las células microbianas y a los altos costes de producción del procedimiento global.

Debe apuntarse que, dentro de la presente descripción y las reivindicaciones, el término "copolímero" (o "copoliéster") incluye cualquier polímero (o poliéster) que consiste en al menos dos comonómeros diferentes, particularmente incluye tanto copolímeros, es decir, polímeros formados por dos monómeros diferentes (tales como P3HB3HV y P3HB4HB) como terpolímeros, es decir, polímeros formados por tres monómeros diferentes (tales como P3HB3HV4HV).

El Solicitante ha encontrado que se pueden producir eficazmente copolímeros de hidroxialcanoato por fermentación microbiana de materias primas de sacarosa, que se pretratan en hidrólisis ácida para transformar la sacarosa en glucosa y fructosa, que a su vez se convierten en ácido 4-cetovalérico para dar una mezcla de monosacáridos y

precursores orgánicos para la síntesis microbiana de copolímeros de hidroxialcanoato.

Por lo tanto, la presente invención se refiere a un procedimiento para producir copolímeros de hidroxialcanoato, como se describe en la reivindicación 1, que comprende:

(i) pretratar una materia prima que contiene sacarosa en una disolución ácida;

5 (ii) alimentar la materia prima pretratada a un biorreactor que contiene células microbianas que producen polihidroxialcanoato;

(iii) cultivar las células microbianas que producen polihidroxialcanoato para formar una masa celular que contiene los copolímeros de polihidroxialcanoato;

(iv) recuperar los copolímeros de polihidroxialcanoato de la masa celular,

10 en donde se alimentan dos materias primas pretratadas diferentes al biorreactor, conteniendo la primera glucosa y fructosa y desprovista sustancialmente de ácido 4-cetovalérico, conteniendo la segunda glucosa y ácido 4-cetovalérico y desprovista sustancialmente de fructosa.

La etapa de pretratamiento en un medio ácido se lleva a cabo preferiblemente: (i-a) acidificando la materia prima que contiene sacarosa para conseguir un valor de pH de 1,0 a 4,0, preferiblemente de 2,0 a 3,0; y (i-b) calentando la materia prima que contiene sacarosa acidificada a una temperatura de 70°C a 250°C, preferiblemente de 100°C a 200°C.

La etapa de pretratamiento tiene la función principal de hidrolizar la sacarosa a glucosa y fructosa, que a su vez se convierten en ácido 4-cetovalérico para dar una mezcla de monosacáridos y precursores orgánicos para la síntesis microbiana de copolímeros de hidroxialcanoato, y particularmente de terpolímeros PHBVV. Debido a que las células microbianas se comportan como "miniplantas" individuales en las que sólo se transportan, metabolizan y sintetizan a polímeros PHA las moléculas del sustrato, no se necesitan procedimientos de purificación complejos y caros de los sustratos obtenidos de la etapa de pretratamiento. Las disoluciones pueden usarse directamente como las disoluciones de alimentación para la biosíntesis microbiana de PHA. Los biopoliésteres acumulados en las células pueden ser recuperados fácilmente del medio acuoso para purificación adicional. La formación in situ del precursor a partir de hexosas resultó ser sumamente eficaz para las etapas posteriores de la biosíntesis microbiana, con costes mucho más bajos con respecto a la adición de precursores orgánicos puros tales como ácido valérico y ácido 4-cetovalérico.

Antes de la fermentación del PHA, las materias primas o el medio deben ser esterilizados para retirar especies de tipo salvaje que competirían con las células que producen PHA por la fuente de carbono y los nutrientes, dando como resultado un rendimiento de PHA bajo y una cantidad sustancial de biomasa no PHA a ser retirada. Según la presente invención, la etapa de pretratamiento es también una operación de esterilización que tiene efectos beneficiosos para la biosíntesis microbiana posterior, y consume poca energía extra en comparación con una fermentación de PHA convencional. Además, la disolución de azúcar pretratada se usa directamente para la producción de copolímeros de hidroxialcanoato, para ahorrar el coste de operaciones adicionales para purificación de carbohidratos y precursores orgánicos.

Descripción detallada de la invención

Con "materia prima que contiene sacarosa" se quiere decir cualquier sustrato que puede ser metabolizado por células microbianas que producen PHA, que contiene sacarosa, posiblemente en mezcla con otros carbohidratos, y que puede obtenerse a partir del procesamiento de materias primas vegetales orgánicas, tales como jugo de frutas, melazas de caña de azúcar, pulpa de remolacha de azúcar, melazas de remolacha de azúcar, y similares. La materia prima, además de sacarosa y posiblemente otros carbohidratos, pueden contener factores de crecimiento orgánicos adicionales, N, P y/o otros minerales como nutrientes para el crecimiento celular.

La etapa de pretratamiento se lleva a cabo preferiblemente en un autoclave o en un reactor. La acidificación de la materia prima se obtiene preferiblemente añadiendo una sustancia ácida, preferiblemente un ácido de Brønsted tal como ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico o mezclas de los mismos, en una cantidad tal para obtener el valor de pH deseado indicado anteriormente. Debe tenerse en cuenta que los sólidos presentes habitualmente en la materia prima que contiene sacarosa, que derivan del procesamiento previo de la materia prima vegetal, pueden tener una fuerte capacidad amortiguadora, es decir, pueden reaccionar o combinarse con los iones H^+ para reducir la concentración de protones libres y por tanto la acidez global. Por lo tanto, la cantidad de la sustancia ácida a ser añadida a la materia prima puede expresarse como relación H^+ /sólido, es decir, como la cantidad de iones H^+ (mmol) que se añadirá a la materia prima para obtener el valor de pH deseado por unidad de peso (g) de sólidos presentes en la materia prima. Habitualmente, la cantidad anterior varía de 0,1 a 3,0 mmol H^+ /g, más preferiblemente de 0,3 a 1,5 mmol H^+ /g.

Según una realización preferida, la materia prima de partida se diluye previamente para obtener una concentración de sólidos de 5% a 30% en peso, más preferiblemente de 10% a 20% en peso, dado que con concentraciones de

sólidos más altas (50% en peso o superiores) se puede producir la formación de subproductos no deseados, tales como huminas o productos de carbonización durante la etapa de hidrólisis térmica. Además, pueden generarse algunos otros subproductos menores a partir de la hidrólisis térmica de sacarosa, glucosa y fructosa, tales como ácido fórmico, ácido acético, hidroximetilfurfural (HMF), que pueden inhibir el crecimiento celular y la formación de PHA cuando sus concentraciones alcanzan niveles altos; controlando las condiciones de reacción según la presente invención, la formación de esos subproductos puede ser reducida sustancialmente para evitar efectos de inhibición celular no deseados.

La etapa de pretratamiento se lleva a cabo preferiblemente durante un tiempo suficiente para obtener la hidrólisis de la sacarosa a glucosa y fructosa, y la conversión posterior de las mismas a ácido 4-cetovalérico para dar una mezcla de monosacáridos y precursores orgánicos. Preferiblemente, la etapa de pretratamiento se lleva a cabo durante un tiempo de 15 min a 12 horas, más preferiblemente de 30 min a 6 horas.

Antes de alimentarla al biorreactor, la materia prima pretratada se enfría preferiblemente hasta la temperatura ambiente (p.ej., de 20°C a 35°C) y después se introduce directamente en el biorreactor (o fermentador). Según una realización preferida, la materia prima pretratada se añade gradualmente para alimentar las células microbianas según una estrategia de alimentación apropiada, lo cual es importante para controlar el crecimiento celular, la biosíntesis de polímeros y la composición de copolímeros. Esta última es de gran importancia para determinar las propiedades de los copolímeros PHA así obtenidos. Teniendo en cuenta que el comportamiento celular no es lineal con el tiempo, la velocidad de alimentación de la materia prima pretratada preferiblemente no es constante a lo largo del tiempo. Por ejemplo, después de una primera adición de la materia prima pretratada en el comienzo de la fermentación, no se hacen más adiciones durante un cierto tiempo (p.ej. durante aproximadamente 8-15 horas), para permitir el crecimiento celular y para mantener las concentraciones de glucosa y ácido 4-cetovalérico dentro de valores relativamente bajos (preferiblemente, de 0 a 20 g/l para la glucosa y de 0 a 2 g/l para el ácido 4-cetovalérico). Después, puede reiniciarse la adición de la materia prima pretratada a una velocidad sustancialmente constante.

A fin de controlar la composición del copolímero, dos materias primas pretratadas diferentes, preparadas por pretratamiento de materias primas que contienen sacarosa como se describe anteriormente, se alimentan al biorreactor, conteniendo la primera glucosa y fructosa y desprovista sustancialmente de ácido 4-cetovalérico, y conteniendo la segunda glucosa y ácido 4-cetovalérico y desprovista sustancialmente de fructosa. La primera materia prima pretratada se alimenta inicialmente para promover el crecimiento celular, mientras se mantiene una relación C/N no más alta que 10 (alto contenido de nutrientes de nitrógeno) (el ácido 4-cetovalérico y otros subproductos son más inhibitorios para las células que los azúcares, y pueden dar como resultado una densidad celular baja). Durante esta etapa, se forma una pequeña cantidad de PHB (generalmente menor que 10% en peso de la masa celular). Después, se inicia la alimentación de la segunda materia prima pretratada, para formar copoliésteres. También, durante esta segunda etapa, es preferible continuar la alimentación de la primera materia prima pretratada junto con la segunda, para controlar la composición monomérica del copolímero y por tanto las propiedades del material. Como se mencionó anteriormente, un contenido de 3HV y 4HV demasiado alto puede dar como resultado algunas desventajas, tales como resistencia y velocidad de cristalización reducidas.

El biorreactor contiene células microbianas que producen polihidroxialcanoato, tales como células de cepa *Ralstonia eutropha*. La etapa de cultivo puede llevarse a cabo en condiciones de pH y temperatura adecuadas para la fermentación. De manera general, la temperatura se mantiene dentro de un intervalo de 25°C a 45°C, preferiblemente de 30°C a 35°C; el valor de pH se mantiene preferiblemente en un valor de 6,0 a 7,5, más preferiblemente de 6,5 a 7,0.

Teniendo en cuenta que la materia prima pretratada es una disolución ácida, para adaptar el valor de pH durante la etapa de cultivo, se alimenta preferiblemente una sustancia básica al biorreactor, tal como una disolución acuosa de amoníaco, que se añade gradualmente para mantener el valor de pH dentro del intervalo deseado. El amoníaco añadido también proporciona un nutriente de nitrógeno para el crecimiento celular. Otras disoluciones alcalinas, tales como hidróxido de sodio y/o hidróxido de potasio, pueden reemplazar a la disolución de amoníaco para controlar la relación de carbono a nitrógeno (C/N) en el medio de cultivo.

La recuperación de los copolímeros de hidroxialcanoato a partir de la masa celular puede llevarse a cabo según técnicas conocidas, como se describe, por ejemplo, en la patente de EE.UU. N° 7.514.525 y la solicitud de patente internacional WO 2011/045625.

Ejemplos

Ejemplo 1 (comparativo)

Un jugo de remolacha de azúcar concentrado que contenía 69% en peso de sólidos totales y 65% en peso de sacarosa se acidificó con una disolución de HCl (30% en peso) en una cantidad correspondiente a 0,56 mmol H⁺/g de sólidos. El jugo de remolacha preacidificado se diluyó adicionalmente con agua para obtener una concentración de sólidos total de 20% en peso.

El jugo de remolacha acidificado y diluido anterior se trató a 170 °C y durante un tiempo total de 10 horas. Las

concentraciones de glucosa, ácido fórmico, ácido 4-cetoaléxico (4-KVA) y 5-hidroximetilfurfural (HMF) se monitorizaron a lo largo del tiempo analizando muestras del jugo tratado (por medio de HPLC). Los resultados se reportan en el gráfico de la Figura 1 adjuntado con la presente memoria. A partir de esos resultados, aparece que la concentración de 4-KVA fue sustancialmente estable después de 4 horas de pretratamiento, mientras que la concentración de HMF, un subproducto que puede ser perjudicial para el crecimiento celular y la formación de PHA, se redujo a menos que 10 g/l aumentando la duración del pretratamiento.

La disolución de hidrólisis así obtenida se usó para el cultivo de una cepa de *R. eutropha* para la producción de PHA. La disolución contenía 81 g/l de glucosa, 36 g/l de 4-KVA, 16 g/l de ácido fórmico, 4 g/l de HMF y 2 g/l de ácido acético. Se usó directamente como la disolución de alimentación del biorreactor sin neutralización y detoxificación. El cultivo se realizó en un biorreactor de mesa bajo condiciones controladas (30 °C, oxígeno disuelto > 10% de saturación de aire y pH 6,4-6,8). El pH del medio se controló con una disolución de amoníaco (15%) y la disolución de hidrólisis ácida. Partiendo de 1.100 ml de disolución mineral para nutrientes básicos de crecimiento celular, la disolución del hidrolizado se introdujo en el biorreactor.

Los volúmenes acumulados de los diversos componentes alimentados al biorreactor a lo largo del tiempo se reportan en la Figura 2 adjuntada con la presente memoria.

Correspondiendo a la estrategia de alimentación de la Figura 2, los cursos de tiempo de la densidad celular, contenido de PHA y % en moles de 3HB, 3HV y 4HV del PHA se reportan en la Figura 3. El monómero predominante en PHBVV es 3HB (71-74% en moles), seguido de 3HV (23-26% en moles), mientras que 4HV es un componente menor (2-3% en moles). Usando una disolución de hidrólisis, la composición química de PHBVV puede ser controlada a un nivel constante en la fermentación de PHA.

En la Figura 4 se reporta el espectro de ¹H-NMR del PHBVV así obtenido.

Ejemplo 2 (invención)

Se preparó una primera disolución de hidrolizados (Disolución A) por hidrólisis térmica de una disolución de melazas de caña de azúcar (20% en peso de sacarosa, pH 2,6) a 120 °C durante 40 min. Los hidrolizados predominantes fueron glucosa y fructosa, con una cantidad despreciable de ácido acético, HMF y ácido 4-cetoaléxico. Se obtuvo una segunda disolución de hidrolizados (Disolución B) a partir de una disolución de remolacha de azúcar con hidrólisis térmica a 170 °C durante 5 horas (véase el Ejemplo 1, Figura 1). Los hidrolizados predominantes fueron glucosa (91 g/l) y ácido 4-cetoaléxico (32 g/l). Los productos menores incluyeron ácido fórmico (14 g/l), HMF (6 g/l), ácido acético (1 g/l). No se detectó fructosa en la Disolución B.

Partiendo de una disolución mineral inicial (1.100 ml), el biorreactor se hizo funcionar en modo de alimentación discontinua con una estrategia de alimentación de las Disoluciones A y B como se representa en la Figura 5, en donde se representan los volúmenes acumulados (ml) de las Disoluciones A y B con el tiempo, así como la relación C/N estimada a partir del carbono de sacarosa original y el N de amoníaco añadidos.

Correspondiendo a la estrategia de alimentación de la Figura 5, los cursos de tiempo de la densidad celular, contenido de PHA y % en moles de 3HB, 3HV y 4HV del PHA se reportan en la Figura 6. Comparado con el Ejemplo 1 (Figura 3), el contenido global de 3HB aumentó (88,4% en moles), mientras que los contenidos de 3HV (11,0% en moles) y 4HV (0,6% en moles) se redujeron. Esto es esperado, porque la Disolución A, desprovista sustancialmente de ácido 4-cetoaléxico, se introdujo en el comienzo y el final del cultivo alimentado de modo discontinuo. De hecho, cuando se usó la Disolución A como única fuente de carbono, se formó P3HB, un homopolíéster, a partir de glucosa y fructosa (datos no mostrados aquí).

Ejemplo 3 (invención)

Se extrajeron P3HB y P3HB3HV4HV puros obtenidos según el Ejemplo 2 (3HB:3HV:4HV = 88,4:11:0,6) de la masa celular liofilizada en cloroformo caliente. Los polímeros disueltos se separaron del cloroformo por precipitación añadiendo metanol gradualmente hasta que se formaron precipitados blancos (75% de metanol y 25% de cloroformo). Los polímeros se filtraron y se secaron al aire y después en estufa para uso posterior.

Cristalización a partir de fundido

Los P3HB y P3HB3HV4HV purificados se fundieron a 180 °C o 160 °C respectivamente, en condiciones ambientales durante aproximadamente 10 min, y después se pusieron inmediatamente sobre la ventana de un Espectroscopio de Infrarrojos de Transformada de Fourier (FTIR) equipado con reflectancia total atenuada (ATR). Cuando los polímeros fundidos se enfriaron, se monitorizaron continuamente las absorciones IR para medir la cristalización de los biopolíésteres. La cristalinidad de los biopolímeros se midió a un número de ondas de 1.184 cm⁻¹ y se representó gráficamente frente al tiempo de enfriamiento. Los resultados se reportan en la Figura 7. El P3HB tuvo una cristalinidad más alta y una velocidad de cristalización más rápida que el PHBVV.

La presencia de 11% en moles de 3-HV y 0,6% en moles de 4-HV en las cadenas principales del PHA no sólo reduce la cristalinidad sino que también retrasa el proceso de cristalización del PHBVV. Dado que una solidificación

lenta del PHA fundido puede causar un problema en el procesamiento térmico de los bioplásticos, controlar la composición química del PHBVV es por lo tanto esencial para preparar un bioplástico con propiedades térmicas y mecánicas deseadas.

Ensayos de tracción

- 5 Se prepararon películas de PHB y PHBVV disolviendo el PHA purificado en cloroformo caliente. Las disoluciones, después de enfriar hasta la temperatura ambiente, se colaron sobre superficies de vidrio limpias en películas finas (aproximadamente 0,3 mm). Las películas se dejaron envejecer al aire durante 5, 15 y 25 días. Las películas se cortaron en tiras finas (10 mm) con áreas de sección transversal aproximada de 3-4 mm² y una longitud inicial de 25 mm. Las tiras se pusieron en una máquina de ensayos de tracción y se sometieron a carga hasta fallo a la rotura.
- 10 Las propiedades mecánicas se reportan en la Tabla 1:

TABLA 1

Propiedades	PHB			PHBVV		
Peso molecular (M _v)	243.000			210.000		
Punto de fusión (°C)	170-180			150-160		
Envejecimiento (días)	5	15	25	5	15	25
Cristalinidad (%)	52,52	54,60	58,65	41,79	41,94	45,58
Módulo elástico (GPa)	0,86	1,14	1,16	0,32	0,37	0,43
Resistencia a la tracción (MPa)	23,20	28,36	29,78	10,80	11,73	13,09
Alargamiento a la rotura (%)	16,6	6,5	4,9	--	--	105

- 15 Los ensayos anteriores revelaron claramente que P3HB es un material rígido con alto módulo elástico y bajo alargamiento a la rotura, mientras que P3HB3HV4HV tiene un módulo elástico relativamente bajo pero alargamiento a la rotura alto. Los resultados también indican que las películas deben ser envejecidas 25 días antes del ensayo de tracción para permitir la evaporación completa del disolvente y la cristalización de las moléculas de PHA. En comparación con el alargamiento a la rotura (ductilidad) del PHB (5%) y PHBV (3HB:3HV = 90:10) (50%) reportado en la bibliografía, el PHBVV (3HB:3HV:4HV = 88,4:11,0:0,6) obtenido según la presente invención exhibe una ductilidad más alta (105%) que el PHBV, probablemente debido a la presencia de una pequeña cantidad de 4HV que altera la cristalinidad del PHBV.
- 20

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para producir copolímeros de hidroxialcanoato, que comprende:
 - (i) pretratar una materia prima que contiene sacarosa en una disolución ácida;
 - (ii) alimentar la materia prima pretratada a un biorreactor que contiene células microbianas que producen polihidroxialcanoato;
 - (iii) cultivar las células microbianas que producen polihidroxialcanoato para formar una masa celular que contiene los copolímeros de polihidroxialcanoato;
 - (iv) recuperar los copolímeros de polihidroxialcanoato de la masa celular;
- 5 en donde se alimentan dos materias primas pretratadas diferentes al biorreactor, conteniendo la primera glucosa y fructosa y desprovista sustancialmente de ácido 4-cetovalérico, conteniendo la segunda glucosa y ácido 4-cetovalérico y desprovista sustancialmente de fructosa.
- 10 2. El procedimiento según la reivindicación 1, en donde la etapa de pretratamiento en un medio ácido se lleva a cabo: (i-a) acidificando la materia prima que contiene sacarosa para conseguir un valor de pH de 1,0 a 4,0; y (i-b) calentando la materia prima que contiene sacarosa acidificada a una temperatura de 70°C a 250°C.
- 15 3. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la materia prima que contiene sacarosa se obtiene a partir del procesamiento de materias primas vegetales orgánicas, tales como jugo de frutas, melazas de caña de azúcar, pulpa de remolacha de azúcar, melazas de remolacha de azúcar, y similares.
4. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde en la etapa de pretratamiento la materia prima se acidifica añadiendo una sustancia ácida.
- 20 5. El procedimiento según la reivindicación 4, en donde la sustancia ácida es un ácido de Brønsted seleccionado de: ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico y mezclas de los mismos.
6. El procedimiento según la reivindicación 4, en donde la sustancia ácida se añade a la materia prima con una relación H⁺/sólido de 0,1 a 3,0 mmol H⁺/g.
- 25 7. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la materia prima de partida se diluye previamente para obtener una concentración de sólidos de 5% a 30% en peso.
8. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la etapa de pretratamiento se lleva a cabo durante un tiempo de 15 min a 12 horas.
9. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la materia prima pretratada, antes de la alimentación al biorreactor, se enfría hasta la temperatura ambiente y después se introduce directamente en el biorreactor.
- 30 10. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la materia prima pretratada se alimenta al biorreactor según una estrategia de alimentación predeterminada, a fin de controlar el crecimiento celular, la biosíntesis del polímero y la composición del copolímero.
11. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la etapa de cultivo se lleva a cabo en condiciones de pH y temperatura adecuadas para la fermentación.
- 35 12. El procedimiento según la reivindicación 11, en donde la etapa de cultivo se lleva a cabo a una temperatura de 25°C a 45°C.
13. El procedimiento según la reivindicación 11, en donde la etapa de cultivo se lleva a cabo a un valor de pH de 6,0 a 7,5.
- 40 14. El procedimiento según la reivindicación 13, en donde, para adaptar el valor de pH durante la etapa de cultivo, se alimenta una sustancia básica al biorreactor.

Fig. 1

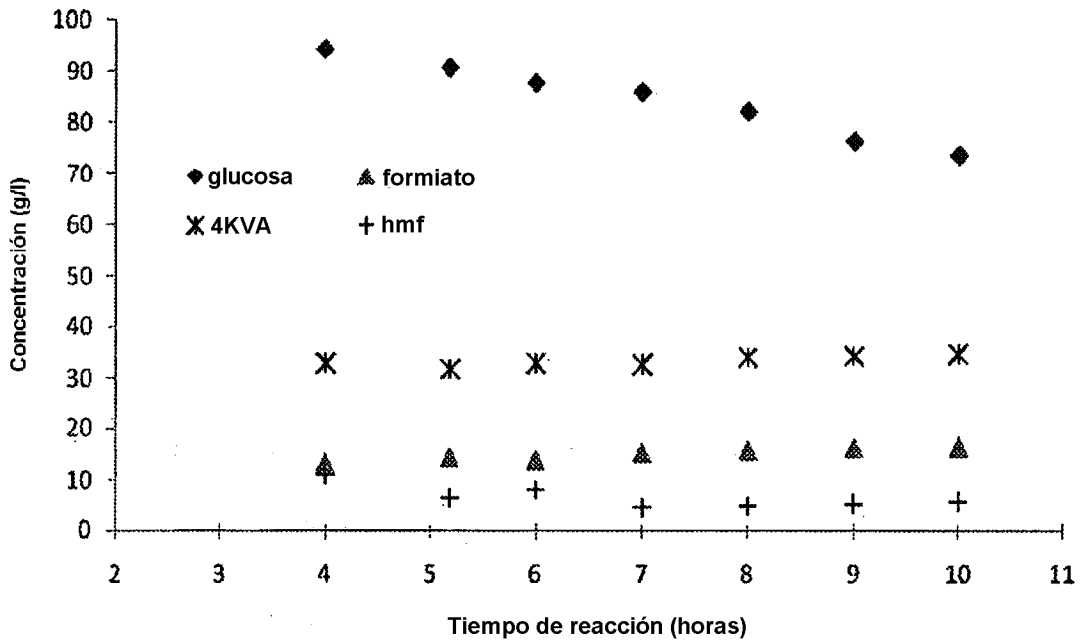


Fig. 2

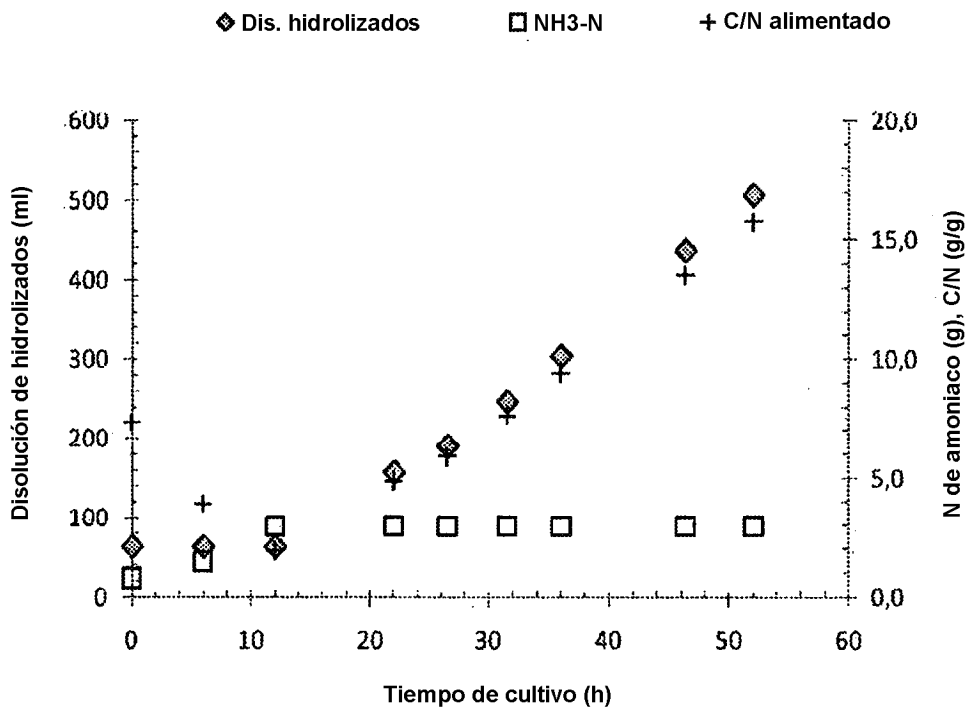


Fig. 3

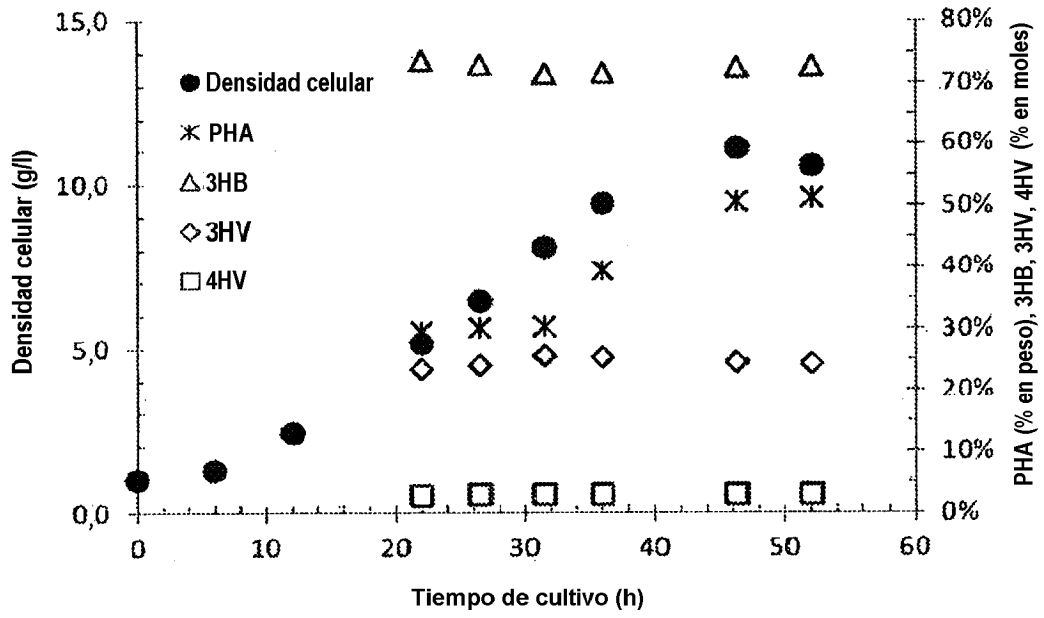


Fig. 4

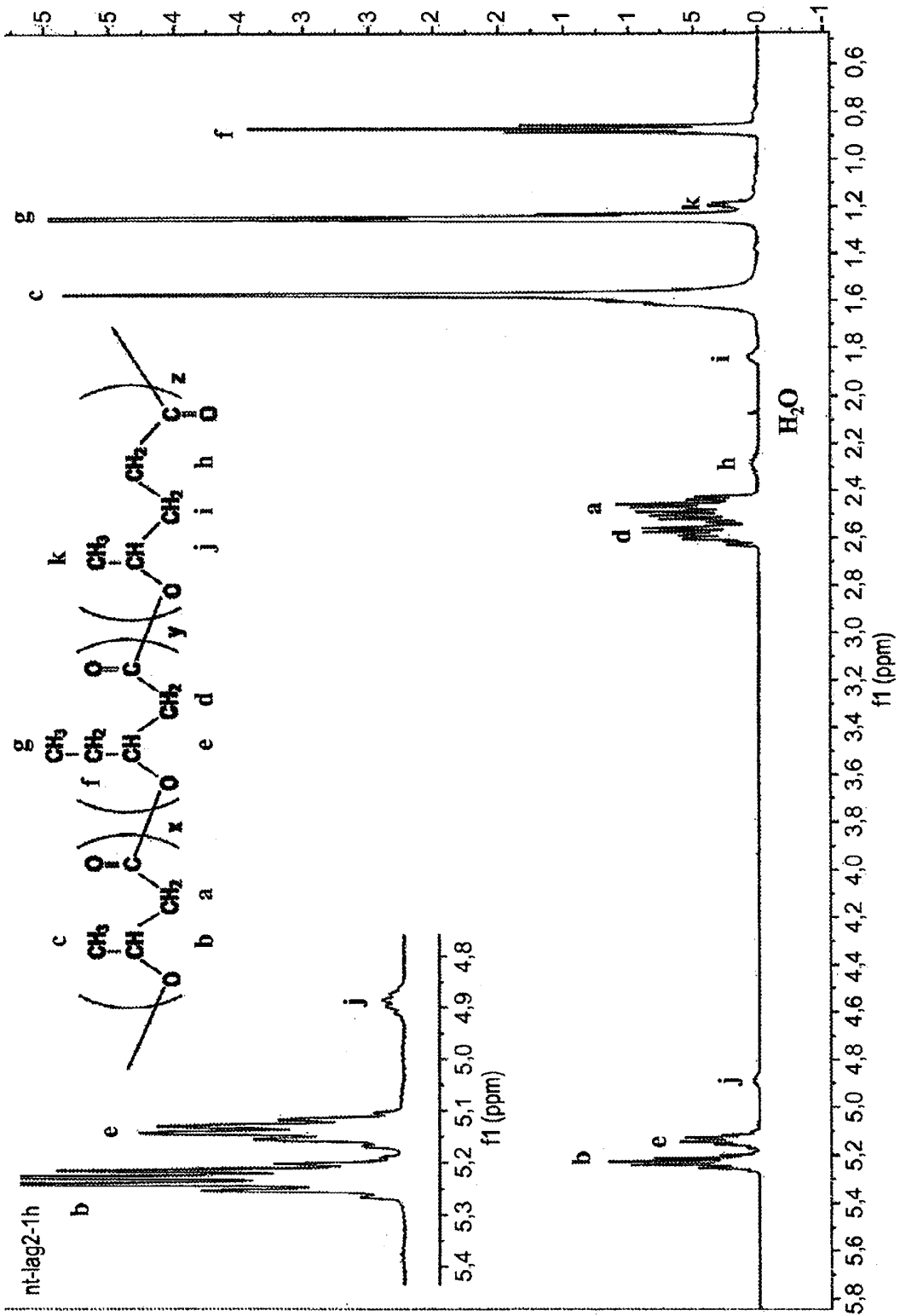


Fig. 5

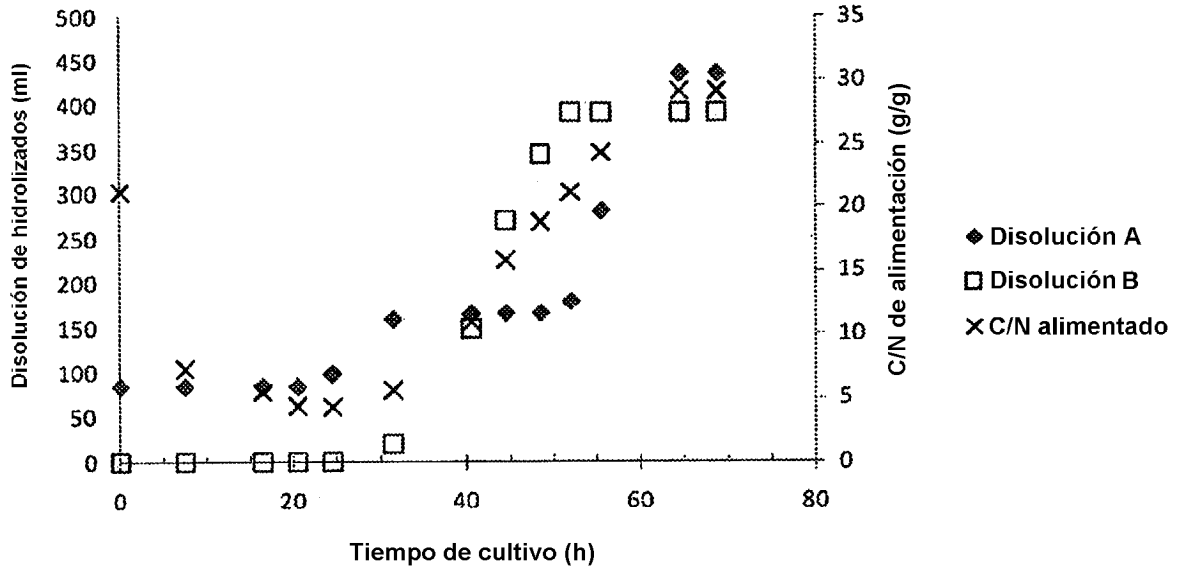


Fig. 6

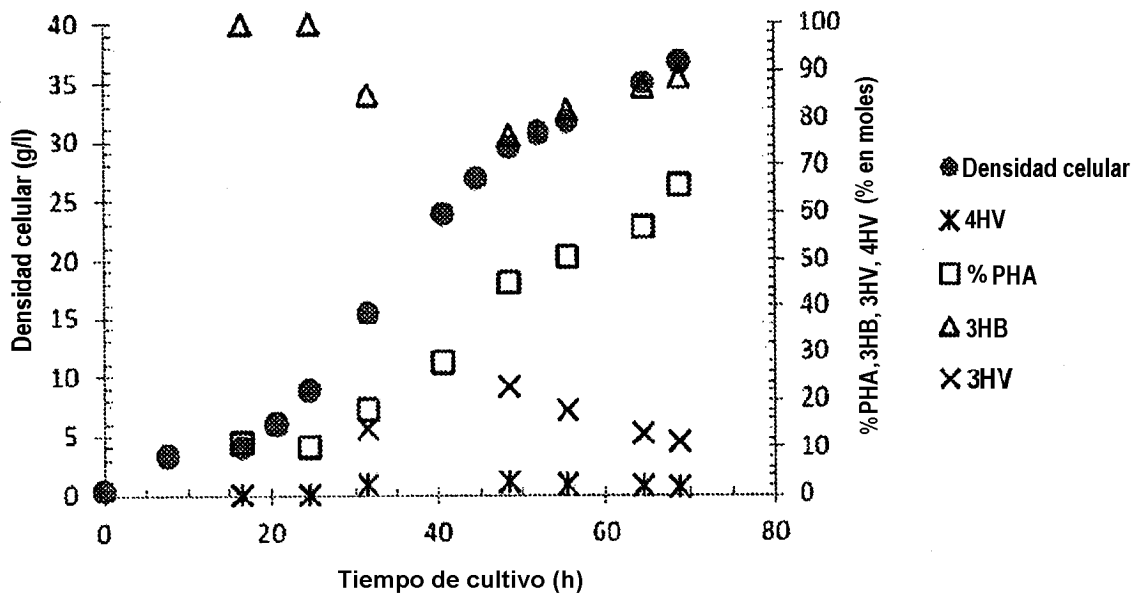


Fig. 7

