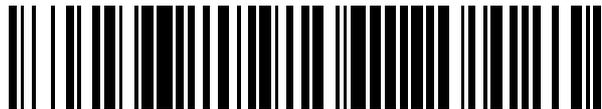


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 624 527**

51 Int. Cl.:

**C12P 7/62** (2006.01)

**C08G 63/06** (2006.01)

**C08G 63/88** (2006.01)

**C08L 101/16** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.12.2009 PCT/JP2009/006546**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.06.2010 WO10067543**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.12.2009 E 09831651 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.02.2017 EP 2366794**

54 Título: **Procedimiento para producir poli-3-hidroxialcanoato y aglomerado de poli-3-hidroxialcanoato**

30 Prioridad:

**09.12.2008 JP 2008313331**

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

**14.07.2017**

73 Titular/es:

**KANEKA CORPORATION (100.0%)  
2-3-18, Nakanoshima  
Kita-ku, Osaka , JP**

72 Inventor/es:

**TAKITA, MASAKI y  
YANAGITA, YOSHIFUMI**

74 Agente/Representante:

**SALVA FERRER, Joan**

ES 2 624 527 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 producir poli-3-hidroxiálcanoato y aglomerado de poli-3-hidroxiálcanoato

5 [Campo técnico]

**[0001]** La presente invención se refiere a un procedimiento para formar aglomerados de ácido poli-3-hidroxiálcanoico a partir de una suspensión acuosa de ácido poli-3-hidroxiálcanoico.

10 [Técnica anterior]

**[0002]** El ácido poli-3-hidroxiálcanoico (en lo sucesivo, abreviado como PHA) es un poliéster termoplástico producido y que se acumula en las células de muchas especies de microorganismos como un material de almacenamiento de energía, y tiene biodegradabilidad. En la actualidad, los plásticos no derivados del petróleo han atraído la atención debido al aumento de la conciencia medioambiental. En particular, han llamado la atención los plásticos biodegradables, tal como PHA, que se incorporan en el reciclaje de material en el mundo natural y por lo tanto los productos de degradación no resultan perjudiciales, y se ha deseado ponerlos en aplicaciones prácticas. Particularmente, dado que el PHA formado y acumulado por microorganismos en los cuerpos celulares se incorpora en el proceso del ciclo de carbono del mundo natural, se esperan menores efectos adversos en el sistema ecológico.

**[0003]** Dado que el PHA producido por un microorganismo generalmente forma un cuerpo granular y se acumula en los cuerpos celulares del microorganismo, es necesaria una etapa de separación y recuperación de PHA del interior de los cuerpos celulares del microorganismo para utilizar el PHA como plástico. Además, para el uso de PHA como plástico, se desea aumentar la pureza del PHA, y reducir el contenido de contaminantes de los componentes constitutivos y similares de los cuerpos celulares, y similares.

**[0004]** Como procedimiento para la degradación y/o eliminación de los componentes distintos del PHA derivado de un organismo, se propuso un procedimiento en el que los componentes distintos de PHA derivados de un organismo se solubilizan y eliminan mediante un tratamiento físico, un tratamiento químico o un tratamiento biológico. Por ejemplo, pueden ejemplificarse un procedimiento en el que se combinan un tratamiento de rotura de cuerpos celulares de un microorganismo que contiene PHA y un tratamiento con un agente tensioactivo (documento de patente 1), un procedimiento en el que un tratamiento térmico después de la adición de un álcali es seguido por un tratamiento de rotura (documento de patente 2), y similares. Además, también se propuso un procedimiento para obtener PHA en el que la suspensión acuosa de los cuerpos celulares de un microorganismo se somete a un tratamiento con hipoclorito de sodio o una enzima para solubilizar los componentes distintos de PHA derivados de un organismo (Documento de Patente 3).

**[0005]** Además, como medio para la recuperación de PHA a partir de una suspensión acuosa obtenida mediante la rotura de los cuerpos celulares de un microorganismo que contiene PHA o componentes solubilizantes distintos de PHA derivados de un organismo, se puede ejemplificar una operación de separación, tal como centrifugación o filtración, u operación de secado, tal como secado por pulverización. Sin embargo, cuando las partículas de PHA producidas por cuerpos celulares se recuperan directamente como partículas primarias, aumentan los polvos finos, y por lo tanto puede establecerse un problema de manipulación difícil del producto.

**[0006]** Es generalmente conocido que la adición de una sal o similar permite a los polvos sólidos agregarse en un líquido de una dispersión líquido-sólido en suspensión fina. Sin embargo, es extremadamente difícil permitir que sólo el PHA diana se agregue a partir de una suspensión acuosa que contiene componentes celulares filtrados de las células rotas, tales como proteínas, además de PHA, y no ha habido ningún ejemplo de tales hallazgos. Incluso si se utiliza sulfato de aluminio, que ha sido ampliamente utilizado en los tratamientos con lodos activados, etc., o similares, es imposible permitir que sólo el PHA diana se agregue selectivamente, ya que casi todos los componentes de la suspensión acuosa se agregan. Además, incluso si el PHA se puede agregar selectivamente con un coagulante polimérico o similar, la calidad como material polimérico puede verse afectada, ya que la separación de estos aditivos del PHA es difícil.

**[0007]** Como procedimiento llevado a cabo sin el uso de un coagulante, se conocen un procedimiento en el que se calienta una suspensión de PHA (documento de patente 4), un procedimiento en el que se repiten calentamiento y refrigeración (documento de patente 5), y similares. En cualquiera de los procedimientos, es un problema la reducción del peso molecular del PHA con el calentamiento, ya que se lleva a cabo un calentamiento hasta alrededor del punto de fusión del PHA.

**[0008]** Por otro lado, se conoce un procedimiento en el que después de disolver PHA en un disolvente orgánico, se añade al mismo a continuación un disolvente orgánico que tiene baja solubilidad o agua para permitir que el PHA así disuelto se deposite. Dado que una solución de PHA se puede purificar de acuerdo con este procedimiento, es posible obtener PHA con una pureza más elevada. Como dicho procedimiento de extracción con disolvente, se ha descrito un ejemplo en el que se usa una cetona inferior o similar como disolvente de extracción (documento de patente 6), un ejemplo en el que se usa tetrahidrofurano (documento de patente 7) y similares. Si se añade un mal

disolvente a un disolvente orgánico que incluye PHA disuelto en el mismo, es posible la deposición del PHA, y es posible controlar comparativamente arbitrariamente la forma y tamaño del depósito, dependiendo del disolvente que se añade, y las condiciones de adición, tales como la temperatura y cantidad de adición, así como condiciones de agitación durante la adición, y similares.

**[0009]** La capacidad de controlar la forma y el tamaño de la materia depositada al permitir que el PHA se deposite a partir de un disolvente orgánico ha sido muy ventajosa en vista de los problemas del PHA purificado usando un disolvente soluble en agua que incluye una gran cantidad de polvos finos. Sin embargo, este proceso ha implicado problemas fundamentales de: uso de una gran cantidad de disolvente orgánico en la extracción; reducción del peso molecular del PHA durante la etapa de purificación, ya que el PHA originalmente altamente degradable se calienta para disolver el mismo; y similares.

**[0010]** Por consiguiente, cuando el PHA producido por un microorganismo se separa y purifica industrialmente, se han presentado problemas de fallos en la obtención de partículas de PHA que tienen un diámetro promedio de partícula en volumen arbitrario con una productividad favorable, a la vez que disminuyen los contaminantes derivados de los componentes constitutivos de los cuerpos celulares, teniendo en cuenta los aspectos ambientales. Además, dado que el parámetro que domina sobre la aglomeración de partículas de PHA no está claro, ha sido aún más difícil proponer medios para resolver estos problemas.

[Documento de la técnica anterior]

[Documento de patente]

**[0011]**

Documento de patente 1: JP-T No. H08-502415  
 Documento de Patente 2: Publicación Internacional PCT No. 2004/065608  
 Documento de Patente 3: JP-A No. 2005-348640  
 Documento de Patente 4: JP-T No. 2000-502399  
 Documento de Patente 5: JP-T No. 2002-517582  
 Documento de Patente 6: JP-T No. H10-504460  
 Documento de Patente 7: JP-A No. H07-79788

El documento EP 1 609 868 describe (ejemplos 1 y 2, tabla 2) un PHBH que tiene un tamaño de partícula de 200  $\mu\text{m}$  y una cantidad total de nitrógeno de 140  $\mu\text{g/g}$ . Además, la tabla 1 de D1 da a conocer PHBH que tiene una cantidad total de nitrógeno de 69  $\mu\text{g/g}$ . Además, D1 da a conocer ([0103]) que los aglomerados de PHA tienen un diámetro en peso de preferiblemente 100  $\mu\text{m}$  o más y hasta 5.000  $\mu\text{m}$ . El ejemplo 2 da a conocer que la suspensión acuosa obtenida después de la distorsión a alta presión se agitó a 50°C y un pH de 7,0 [0122]. Los agregados obtenidos tienen un tamaño de partícula de 203  $\mu\text{m}$ .

El documento US 5 798 440 describe (ejemplos y tablas 1-3) aglomerados de copolímero de PHB/V que tienen un tamaño promedio en peso de 250-346 micras. El documento US 2007/161096 describe un proceso para la recuperación de polihidroxialcanoatos (PHA) a partir de biomasa celular de las bacterias, obteniéndose dicha biomasa por fermentación y en forma de una suspensión de biomasa celular en suspensión acuosa, que comprende las etapas de: someter la suspensión a operaciones de inyección de disolvente PHA, agitación y calentamiento, con el fin de formar una suspensión que comprende disolvente PHA con el PHA disuelto, el agua y residuos insolubles; recuperar el disolvente enriquecido con PHA; enfriar rápidamente la solución de disolvente PHA para precipitar el PHA disuelto; microfiltrar la suspensión de PHA precipitada en el disolvente, con el fin de separar una pasta concentrada con PHA precipitado; lavar con agua, calentar y agitar la pasta de PHA concentrada, para promover la evaporación del disolvente y obtener una suspensión que contiene gránulos de PHA; agitar y cortar por cizalladura los gránulos de PHA y agotar el disolvente residual; y separar las partículas de PHA purificadas de la suspensión.

[DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN]

[Problemas a resolver por la invención]

**[0012]** Los problemas a resolver por la presente invención son, al separar y purificar industrialmente PHA producido por un microorganismo, obtener partículas de PHA que tienen un diámetro de partícula promedio en volumen arbitrario con una productividad favorable y con una disminución en la cantidad de disolvente orgánico usado, a la vez que se disminuyen los contaminantes derivados de los componentes constitutivos de los cuerpos celulares, sin la adición de una sal, un coagulante polimérico o similar, y también sin llevar a cabo un tratamiento a alta temperatura.

[Medios para resolver los problemas]

**[0013]** Los inventores encontraron que el PHA se agrega sin la adición de una sal, un coagulante polimérico o similar, a una temperatura comparativamente baja sin calentar hasta alrededor del punto de fusión de PHA,

mediante el ajuste del pH de una suspensión acuosa que contiene PHA para que caiga dentro de una región ácida. Por consiguiente, de esta manera se llevó a cabo la presente invención.

5 **[0014]** La presente invención se refiere a un procedimiento para producir PHA, incluyendo el ajuste del pH de una suspensión acuosa de PHA para que caiga dentro de una región ácida para obtener aglomerados de PHA.

**[0015]** Según la presente invención, la región ácida es preferiblemente una región de pH no inferior a 2.

10 **[0016]** Según la presente invención, la cantidad de nitrógeno orgánico presente en la suspensión acuosa de PHA es preferiblemente no mayor que 6000 ppm por peso del PHA.

15 **[0017]** Según la presente invención, un disolvente incluido en la suspensión acuosa de PHA contiene preferiblemente agua, un disolvente orgánico que es miscible con agua, o un disolvente mixto de agua y el disolvente orgánico.

**[0018]** Según la presente invención, el PHA es preferiblemente un copolímero constituido con dos o más tipos de ácido 3-hidroxialcanoico seleccionados del grupo que consiste en 3-hidroxipropionato, 3-hidroxibutirato, 3-hidroxivalerato, 3-hidroxihexanoato, 3-hidroxihexanoato y 3-hidroxioctanoato.

20 **[0019]** Según la presente invención, el PHA es preferiblemente un copolímero binario de 3-hidroxihexanoato y 3-hidroxibutirato, o un copolímero ternario de 3-hidroxihexanoato, 3-hidroxibutirato y 3-hidroxivalerato.

**[0020]** Según la presente invención, el PHA se produce preferiblemente utilizando un microorganismo.

25 **[0021]** Según la presente invención, el microorganismo pertenece al género *Aeromonas*, género *Alcaligenes*, género *Ralstonia*, o género *Cupriavidus*.

**[0022]** Según la presente invención, el microorganismo es *Cupriavidus necator*.

30 **[0023]** Además, la presente invención se refiere a aglomerados de PHA producidos mediante el procedimiento mencionado anteriormente que tiene una cantidad de nitrógeno orgánico no mayor de 500 ppm.

**[0024]** Los aglomerados de PHA tienen preferiblemente un diámetro de partícula promedio en volumen de no menos de 20  $\mu\text{m}$ .

35 [Efectos de la invención]

**[0025]** Según la presente invención, el PHA producido por un microorganismo puede purificarse no mediante una operación de extracción con un disolvente orgánico, y la aglomeración de PHA se consigue a una temperatura menor que el punto de fusión de PHA sin la adición de un tercer componente, tal como una sal o un coagulante polimérico. Los aglomerados de PHA con un menor número de polvos finos se pueden obtener con una productividad superior, a la vez que se previene la contaminación con componentes constitutivos de los cuerpos celulares. Los aglomerados de PHA obtenidos de este modo no requieren preocupaciones acerca de las influencias sobre la calidad que pueden ser causadas por la adición de una tercera sustancia, y se puede evitar la disminución del peso molecular de PHA por calentamiento.

[Modo de llevar a cabo la invención]

50 **[0026]** El microorganismo para usar en la presente invención no está particularmente limitado, siempre que sea un microorganismo que produce intracelularmente PHA. Se pueden utilizar un microorganismo aislado de fuentes naturales, un microorganismo depositado con un Depositario de Microorganismos (por ejemplo, IFO, ATCC, etc.), una variante o un transformante que se pueden preparar a partir del mismo, o similar. Por ejemplo, se pueden usar bacterias del género *Cupriavidus*, del género *Alcaligenes*, del género *Ralstonia*, del género *Pseudomonas*, del género *Bacillus*, del género *Azotobacter*, del género *Nocardia* y del género *Aeromonas*, y similares. De éstos, se prefiere un microorganismo que pertenece al género *Aeromonas*, el género *Alcaligenes*, el género *Ralstonia* o el género *Cupriavidus*. En particular, es más preferido una cepa de *Alcaligenes lipolytica* (*A. lipolytica*), *Alcaligenes Latus* (*A. latus*), *Aeromonas caviae* (*A. caviae*), *Aeromonas hydrophila* (*A. hydrophila*), *Cupriavidus necator* (*C. Necator*) o similares, y *Cupriavidus necator* es el más preferido. Además, cuando el microorganismo no tiene originalmente capacidad para producir PHA o produce sólo una pequeña cantidad de PHA, se puede introducir un gen de la sintasa del PHA pretendido y/o una variante del mismo en el microorganismo, y se puede usar el transformante resultante. Aunque el gen de la sintasa de PHA que se puede utilizar en la producción de dicho transformante no está particularmente limitado, se prefiere un gen de la sintasa de PHA derivado de *Aeromonas caviae*. Mediante el cultivo de estos microorganismos en condiciones apropiadas, se pueden obtener cuerpos celulares de un microorganismo que incluyen PHA acumulado en los cuerpos celulares. Aunque el proceso de cultivo no está particularmente limitado, por ejemplo, se puede utilizar un procedimiento descrito en JP-A N° H05-93049 o similar.

**[0027]** El PHA en la presente invención es un nombre genérico de un polímero constituido con ácido 3-hidroxiálcanoico como unidad monomérica. Aunque el ácido 3-hidroxiálcanoico constituyente no está particularmente limitado, se pueden ejemplificar específicamente, un copolímero de 3-hidroxi-butirato (3HB) y otro ácido 3-hidroxiálcanoico, un copolímero de ácido 3-hidroxiálcanoico que incluye 3-hidroxi-hexanoato (3HH), o similares. Además, también se pueden ejemplificar copolímeros de dos o más tipos de ácido 3-hidroxiálcanoico seleccionados del grupo que consiste en 3-hidroxi-propionato, 3-hidroxi-butirato, 3-hidroxi-valerato, 3-hidroxi-hexanoato, 3-hidroxi-heptanoato y 3-hidroxi-octanoato como unidades monoméricas. Entre éstos, son más preferidos los copolímeros que incluyen 3HH como una unidad monomérica, por ejemplo, un copolímero binario (PHBH) de 3HB y 3HH (Macromolecules, 28, 4822-4828 (1995)), o un copolímero ternario (PHBVH) de 3HB, 3-hidroxi-valerato (3HV) y 3HH (Patente japonesa No. 2777757, JP-A No. H08-289797) en vista de las propiedades físicas del poliéster resultante. En este documento, la relación de composición de cada unidad monomérica que constituye el copolímero binario de 3HB y 3HH, es decir, PHBH, no está particularmente limitada; sin embargo, es adecuada una relación de composición de la unidad de 3HH de 1 a 99% en moles, preferiblemente de 1 a 50% en moles, y más preferiblemente de 1 a 25% en moles, siempre que la suma total de todas las unidades monoméricas sea del 100% en moles. Además, la relación de composición de cada unidad monomérica que constituye el copolímero ternario de 3HB, 3HV y 3HH, es decir, PHBVH no está particularmente limitada; sin embargo, las relaciones de composición se encuentran adecuadamente dentro del intervalo de, por ejemplo, unidad de 3HB de 1 a 95% en moles, unidad de 3HV de 1 a 96% en moles, y unidad de 3HH de 1 a 30% en moles, respectivamente, siempre que la suma total de todas las unidades monoméricas sea del 100% en moles.

**[0028]** Al llevar a cabo la etapa de aglomeración en la presente invención, se añade un ácido a una suspensión acuosa de PHA con el fin de ajustar el pH de la suspensión acuosa de PHA para que caiga dentro de una región ácida. El ácido usado para este propósito no está particularmente limitado y puede ser o bien un ácido orgánico o un ácido inorgánico, y puede tener o no volatilidad. También, por ejemplo, se puede utilizar un ácido fuerte, tal como ácido sulfúrico o ácido clorhídrico, o un ácido débil, tal como ácido fosfórico o ácido acético. Además, en la aglomeración se hace que el pH de la suspensión acuosa de PHA caiga dentro de una región de pH preferiblemente no inferior a 2, más preferiblemente pH no inferior a 3, y aún más preferiblemente pH no inferior a 4. Además, con respecto al límite superior de la región ácida preferible, el pH cae dentro de una región de pH preferiblemente no mayor que 7, más preferiblemente pH no mayor que 6, y aún más preferiblemente pH no mayor que 5. Además, con el fin de que los aglomerados de PHA resultantes tengan un tamaño de partícula mayor, puede realizarse una operación de calentamiento en la etapa de aglomeración. Aunque la temperatura de calentamiento no está particularmente limitada, es inferior al punto de fusión del PHA, que es inferior al punto de fusión del PHA preferiblemente en al menos 5°C, más preferiblemente en al menos 10°C, y aún más preferiblemente en 20 a 30°C. Con el fin de inhibir la reducción del peso molecular del PHA, se desea una temperatura más baja. Específicamente, la temperatura de calentamiento es preferiblemente no superior a 150°C, más preferiblemente no superior a 120°C, y aún más preferiblemente no superior a 90°C. Aunque el límite inferior de la temperatura de calentamiento no está particularmente limitado, con el fin de producir aglomerados que tengan un tamaño de partícula mayor, el límite inferior es preferiblemente de no inferior a 20°C, y más preferiblemente no inferior a 30°C. El período de tiempo requerido para elevar la temperatura puede variar en función del tamaño del aparato y de la capacidad; sin embargo, es necesario calentar lo suficiente hasta alcanzar la temperatura a la que se efectúa la aglomeración de PHA y aumenta el tamaño de partícula. El período de tiempo de calentamiento después de alcanzar la temperatura de calentamiento mencionada anteriormente es de aproximadamente 5 horas o menos, preferiblemente 2 horas o menos, más preferiblemente 1 hora o menos, y aún más preferiblemente 30 min o menos. Se prefiere un calentamiento durante al menos 1 s o más. Tampoco la concentración de PHA en la suspensión acuosa de PHA está particularmente limitada, teniendo en cuenta las influencias de agitación y similares cuando se agita, la concentración de PHA es preferiblemente no superior al 40% en peso, más preferiblemente no superior al 20% en peso, y aún más preferiblemente no superior al 10% en peso. El límite inferior de la concentración de PHA no está particularmente limitado; sin embargo, es preferiblemente no inferior al 1% en peso para la realización eficiente de la aglomeración. Estas operaciones pueden ser en continuo o discontinuo. La suspensión acuosa puede agitarse o no. La aglomeración como se usa en el presente documento significa que el diámetro de partícula promedio en volumen de partículas de PHA se convierte al menos cinco veces, deseablemente al menos diez veces, y más deseablemente al menos 15 veces, con respecto al diámetro promedio de partícula en volumen de PHA antes de someterse a la operación de aglomeración.

**[0029]** El disolvente incluido en la suspensión acuosa en la presente invención puede incluir agua, un disolvente orgánico que es miscible con agua, o un disolvente mixto de agua y el disolvente orgánico. El disolvente orgánico usado puede ser de un solo tipo, o se pueden utilizar dos o más tipos combinados. Además, la concentración del disolvente orgánico en el disolvente mixto de agua y el disolvente orgánico no está particularmente limitado, siempre que no esté más allá de la solubilidad del disolvente orgánico usado en agua. Además, aunque el disolvente orgánico que es miscible con agua no está particularmente limitado, por ejemplo, se pueden ejemplificar alcoholes, tales como metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol, 1-butanol, 2-butanol, iso-butanol, pentanol, hexanol y heptanol, cetonas, tales como acetona y metil etil cetona, éteres, tales como tetrahydrofurano y dioxano, nitrilos, tales como acetonitrilo y propionitrilo, amidas, tales como dimetilformamida y acetamida, dimetilsulfóxido, piridina, piperidina, y similares. Entre estos, son adecuados el metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol, 1-butanol, 2-butanol, iso-butanol, acetona, metil etil cetona, tetrahydrofurano, dioxano, acetonitrilo, propionitrilo y similares a la luz de su facilidad de

extracción y similares. Aún más, son más preferibles el metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol, 1-butanol, 2-butanol, iso-butanol, acetona y similares en vista de la disponibilidad favorable. Aún más preferibles son metanol, etanol y acetona. Cabe señalar que otro disolvente y/o componentes derivados de los cuerpos celulares y compuestos generados durante la purificación pueden estar contenidos, siempre y cuando las características esenciales de la presente invención se vean afectadas.

**[0030]** Se prefiere que la cantidad de nitrógeno orgánico en la suspensión acuosa de PHA se disminuya mediante la realización previa de una etapa de degradación y/o eliminación de impurezas incluidas en la suspensión acuosa de PHA (en particular, componentes distintos de PHA derivados de un organismo y componentes derivados del sustrato de cultivo) antes de la etapa de aglomeración para permitir que el PHA se agregue mediante el ajuste del pH de la suspensión acuosa de PHA para que caiga dentro de la región ácida. En consecuencia, el PHA se agrega de manera eficiente en la etapa de aglomeración que sigue y, de este modo, se facilita la obtención de PHA altamente purificado. Puede representarse un marcador para la degradación y/o eliminación de las impurezas en términos de la cantidad de nitrógeno orgánico por peso de PHA incluido en la suspensión acuosa de PHA. La cantidad de nitrógeno orgánico es preferiblemente no superior a 6.000 ppm, más preferiblemente no superior a 4.000 ppm, más preferiblemente no superior a 2.000 ppm, aún más preferiblemente no superior a 1.500 ppm, y lo más preferiblemente no superior a 1000 ppm por peso del PHA.

**[0031]** Antes de la degradación y/o eliminación de impurezas de componentes distintos de PHA derivados de un organismo, y similares, en la presente invención, se prefiere romper previamente las células que contienen PHA mediante un tratamiento físico, un tratamiento químico o un tratamiento biológico. En consecuencia, se puede realizar de manera eficiente una etapa de degradación y/o eliminación posterior. Aunque el proceso de rotura no está particularmente limitado, puede utilizarse cualquier proceso llevado a cabo utilizando la fuerza de cizallamiento del fluido o fuerza de cizallamiento del sólido, o por molienda, por medio de una prensa francesa convencional bien conocida, un homogeneizador, una prensa X, un molino de bolas, un molino coloidal, un molino DYNO, un homogeneizador ultrasónico o similares. Alternativamente, se utiliza un proceso en el que se utiliza un agente, tal como un ácido, álcali, agente tensioactivo, disolvente orgánico, inhibidor de la síntesis de la pared celular o similar, se puede ejemplificar un proceso en el que se utiliza una enzima, tal como lisozima, pectinasa, celulasa o zimoliasa, un proceso en el que se utiliza fluido supercrítico, un proceso de rotura osmótica, un proceso de congelación, un proceso de rotura en seco, y similares. Además, también se ejemplifica un proceso de autólisis llevado a cabo utilizando una acción de la proteasa, esterasa, etc., incluidas en la células per se como un tipo de proceso de rotura. En el proceso de rotura anterior, se desea seleccionar un proceso capaz de inhibir la reducción del peso molecular de PHA mediante una serie de tratamientos. Además, estos procesos de rotura se pueden utilizar solos o se puede utilizar una pluralidad de procesos combinados. También, se pueden realizar un procesamiento de forma discontinua o un procesamiento en continuo.

**[0032]** En general, una suspensión acuosa de PHA preparada mediante la rotura de los cuerpos celulares que contienen PHA de acuerdo con el procedimiento mencionado anteriormente está contaminada con proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y componentes de azúcar en las células, y otros componentes constitutivos de los cuerpos celulares, residuos de sustratos de cultivo y similares. Se prefiere llevar a cabo una etapa de deshidratación para separar el agua que contienen estas proteínas y similares antes de la etapa de degradación y/o eliminación descrita a continuación. En consecuencia, la cantidad de impurezas incluidas en la suspensión acuosa de PHA puede reducirse, y por tanto la etapa de degradación y/o eliminación se puede llevar a cabo de manera eficiente. Aunque el proceso de deshidratación no está particularmente limitado, se pueden ejemplificar un proceso de filtración, separación centrífuga o separación por precipitación. La concentración de PHA en la suspensión acuosa sometida a la etapa de degradación y/o eliminación no está particularmente limitada, que es preferiblemente no inferior a 50 g/l, más preferiblemente no inferior a 100 g/l, aún más preferiblemente no inferior a 200 g/l, y aún más preferiblemente no inferior a 300 g/l. Además, la etapa de deshidratación mencionada anteriormente puede realizarse con el fin de ajustar la concentración de PHA en la suspensión acuosa.

**[0033]** El proceso de degradación y/o eliminación de impurezas, tales como componentes distintos de PHA derivados del organismo no está particularmente limitado y, por ejemplo, se puede ejemplificar un proceso llevado a cabo utilizando una enzima. La enzima que se puede utilizar incluye una enzima proteolítica, una enzima lipolítica, enzima que degrada la pared celular, una enzima nucleolítica, y similares. Ejemplos específicos de estas enzimas incluyen los siguientes. Se pueden utilizar solas o se pueden utilizar dos o más combinados.

**[0034]**

(1) Enzima proteolítica

Esperasa, Alcalasa, pepsina, tripsina, papaína, quimotripsina, aminopeptidasa, carboxipeptidasa, y similares

(2) Enzima lipolítica

lipasa, fosfolipasa, colinesterasa, fosfatasa, y similares

(3) Enzima que degrada la pared celular

lisozima, amilasa, celulasa, maltasa, sacarasa,  $\alpha$ -glicosidasa,  $\beta$ -glicosidasa, N-glicosidasa, y similares

(4) enzima nucleolítica

ribonucleasa, desoxirribonucleasa, y similares.

**[0035]** La enzima utilizada en la degradación de impurezas, tales como componentes distintos de PHA derivados del organismo no se limita a los descritos anteriormente, y puede ser una enzima arbitraria que tiene una actividad de degradación de los componentes derivados del organismo, siempre que pueda ser utilizada en productos industriales. Además, en general, también se puede utilizar un detergente de enzimas disponible comercialmente utilizado para el lavado o similares. Aún más, también es aceptable una composición enzimática que contiene, por ejemplo, un agente de estabilización de una enzima, un agente de redeposición antisuelo, etc., y la enzima, y no se limita necesariamente al uso de solamente una enzima. Las enzimas proteolíticas preferibles que pueden usarse industrialmente incluyen, entre las enzimas ilustradas anteriormente, proteasa A, proteasa P, proteasa N (todas fabricadas por Amano Enzyme inc.), Esperasa, Alcalasa, Savinasa, Everlasa (todas fabricadas por Novozymes A/S), y similares, y se pueden utilizar de manera adecuada también en vista de la actividad de degradación, pero no se limitan a las mismas.

**[0036]** El tratamiento enzimático se lleva a cabo preferiblemente hasta que se alcanza un grado deseado del tratamiento, y el período de tiempo es generalmente de 0,5 a 2 horas. La cantidad de la enzima a utilizar depende del tipo y de la actividad de la enzima, y no está particularmente limitada, que es preferiblemente de 0,001 a 10 partes en peso, y en vista del coste, más preferiblemente de 0,001 a 5 partes en peso con respecto a 100 partes en peso de PHA.

**[0037]** Otro procedimiento para la degradación de impurezas, tales como componentes distintos de PHA derivados del organismo, incluye un proceso en el que se usa ácido hipocloroso o peróxido de hidrógeno. Cuando se usa ácido hipocloroso, el pH del sistema se ajusta para que caiga dentro de una región alcalina, y la degradación se realiza en condiciones en las que el calor, la luz, o el contacto con el metal se pueden inhibir, por lo que se puede obtener PHA que tiene una baja cantidad de cloro restante. El pH es deseablemente no inferior a 8, más deseablemente no inferior a 10, y aún más deseablemente no inferior a 12. La temperatura de tratamiento es deseablemente no superior a 40°C, más deseablemente no superior a 30°C, aún más deseablemente no superior a 20°C, y para conseguir de forma segura los efectos, el tratamiento se lleva a cabo a no más de 10°C.

**[0038]** Tal como se ha descrito anteriormente, en la etapa de deshidratación mencionada anteriormente, para la separación del PHA del agua que contiene impurezas, tales como otros componentes derivados del organismo, se pueden llevar a cabo una filtración, separación centrífuga o similares. Aunque el proceso de filtración no está particularmente limitado, se desea un proceso llevado a cabo usando Nutsche o similar, o un proceso, tal como filtración por succión o filtración a presión. Para aplicaciones industriales, se pueden seleccionar equipos de filtración que tienen una función de prensado, tales como una prensa de filtro, prensa de tubo, prensa de placas, prensa manométrica, prensa mediante cintas, prensa con tornillos o prensa de disco, así como un deshidratador centrífugo, un elemento de filtración cilíndrico múltiple o similares. Cuando se pretende mejorar la productividad, se desea un tipo continuo, tal como un elemento de filtración cilíndrico múltiple. Como procedimiento para eliminar los residuos de partículas en un elemento de filtración de tipo continua, se pueden utilizar un sistema de cadena, un sistema rascador, un sistema rascador con precubrimiento o similares. Alternativamente, se puede emplearse también un sistema de separación de membranas. Como proceso para la filtración que implica la separación de membrana, se puede seleccionar una filtración "dead-end" o filtración de flujo con tela. Cualquier caso puede seleccionarse en base a la capacidad de filtración, el grado de obstrucción del material de filtro, la membrana y similares. Además, se puede proporcionar presión reducida o vacío, o se puede permitir la compresión. Además, se puede utilizar un proceso en el que se emplea la fuerza centrífuga. Como material de filtro, se puede seleccionar cualquiera de una variedad de materiales, tales como un papel, tela tejida, tela no tejida, tamiz, placa sinterizada, cerámica no vidriada, membrana de polímero, metal con perforaciones o alambres con cuñas. Cualquiera puede seleccionarse dependiendo de la productividad y el grado de obstrucción y similares. También, se puede utilizar o no un agente auxiliar de filtración. Cuando se utiliza un agente auxiliar de filtración, se puede utilizar un proceso de recubrimiento previo del agente auxiliar de filtración sobre el material de filtro de antemano (es decir, el sistema de recubrimiento previo), o un proceso de adición previa a un líquido sometido a la filtración (es decir, procedimiento de alimentación del cuerpo).

**[0039]** Aunque el proceso de separación centrífuga en la etapa de deshidratación mencionada anteriormente no está particularmente limitado, se pueden utilizar un sedimentador centrífugo, un deshidratador centrífugo o similar. En el caso de un sedimentador centrífugo, se pueden ejemplificar un tipo separador, un tipo cilíndrico, y un tipo decantador. En el caso del tipo de separador, se pueden ejemplificar un tipo de disco, un tipo de auto-limpieza, un tipo de boquilla, un tipo de decantador con husillo, un tipo filtro "skimming", y similares. Dependiendo del procedimiento de descarga de componentes precipitados, hay de tipo lote y tipo continuo, respectivamente. También, con respecto a la deshidratador centrífugo, puede ser de tipo lote y tipo continuo. Con estos equipos se produce la separación de los precipitados que contienen PHA de los componentes líquidos de cultivo en base a la diferencia de gravedad específica.

**[0040]** Otro proceso que puede utilizarse en la etapa de deshidratación anterior puede incluir un proceso de flotación, un proceso de electroforesis, un procesamiento con ciclón, y similares. Los procesos de filtración y separación centrífuga, así como de flotación, se pueden usar solos o combinados.

**[0041]** Después de recuperar el PHA mediante el proceso, tal como filtración y/o separación centrífuga en la etapa de deshidratación mencionada anteriormente, el PHA recuperado se lava con agua o similar, mediante lo cual se puede obtener un PHA más purificado. El lavado puede llevarse a cabo utilizando no sólo agua, sino también un disolvente orgánico, y el agua y un disolvente orgánico se pueden usar como una mezcla. Además, se puede ajustar el pH del agua. Cuando se utiliza un disolvente orgánico como disolvente de lavado, se puede usar, preferiblemente, un disolvente hidrófilo, y más específicamente metanol, etanol, acetona, acetonitrilo, tetrahidrofurano, una cetona, una amina o similares. Además, se pueden añadir un tensioactivo o similar al agua. Se puede usar una pluralidad de tipos de estos disolventes orgánicos y agua como una mezcla. Además, el agua o el disolvente orgánico se pueden calentar o pulverizarse en forma de vapor para mejorar la propiedad de lavado, siempre que este proceso se lleve a cabo en un corto período de tiempo.

**[0042]** Tal como se ha explicado anteriormente, de acuerdo con el procedimiento de la presente invención, los aglomerados de PHA se pueden producir eficazmente mediante la realización de forma secuencial: una etapa de cultivo del cultivo de un microorganismo que tiene la capacidad de producir intracelularmente PHA; una etapa de rotura de la rotura del microorganismo que contiene PHA; una etapa de deshidratación de separación del agua de una suspensión acuosa que contiene el microorganismo así roto; una etapa de purificación de la degradación y/o eliminación de impurezas; una etapa de lavado del lavado de PHA; y una etapa de aglomeración de ajuste del pH de la suspensión acuosa de PHA resultante a una región ácida para obtener aglomerados de PHA. Sin embargo, la presente invención no requiere necesariamente llevar a cabo todas las etapas descritas anteriormente.

**[0043]** Al llevar a cabo la etapa de aglomeración de la presente invención de esta manera después de la realización de la etapa de purificación de degradación y/o eliminación de impurezas derivadas de los cuerpos celulares y el sustrato de cultivo, y/o la etapa de lavado, se pueden obtener aglomerados de PHA altamente purificados. También, mediante el lavado adicional de los aglomerados obtenidos en el proceso de lavado descrito anteriormente, según sea necesario, se pueden obtener aglomerados de PHA aún más purificados.

**[0044]** A partir de lo anterior, se consigue la producción de aglomerados de PHA que tienen una cantidad de nitrógeno orgánico no superior de 500 ppm, preferiblemente no superior de 400 ppm, más preferiblemente no superior de 300 ppm, aún más preferiblemente no superior de 200 ppm, y en particular preferiblemente no superior de 100 ppm. Además, a partir de lo anterior, se consigue la obtención de aglomerados de PHA con un polvo menos fino. Los aglomerados de PHA obtenidos de este modo tienen un diámetro de partícula promedio en volumen de preferiblemente no menos de 20  $\mu\text{m}$ , más preferiblemente no menos de 30  $\mu\text{m}$ , y aún más preferiblemente no menos de 100  $\mu\text{m}$ . Aunque el límite superior no está particularmente limitado, se pueden obtener aglomerados de PHA que tienen un diámetro de partícula promedio en volumen no superior de aproximadamente 5000  $\mu\text{m}$  de acuerdo con la presente invención.

**[0045]** Los aglomerados de PHA producidos de esta manera que tienen un contenido bajo de nitrógeno orgánico se pueden procesar fácilmente también en vista del diámetro de partícula promedio en volumen. Además, también debido a la inclusión de una menor cantidad de impurezas, se puede esperar una variedad de aplicaciones, por ejemplo, no solamente para artículos, tales como películas y botellas, sino también una amplia gama de aplicaciones en el uso médico, ya que tienen una baja alergenicidad.

[EJEMPLOS]

**[0046]** En lo sucesivo, la presente invención se explica con más detalle por medio de Ejemplos a continuación.

(Procedimiento para la determinación de la cantidad de nitrógeno orgánico en una suspensión acuosa de PHA (por peso de PHA))

**[0047]** Se evaporó la totalidad de un disolvente soluble en agua en una suspensión acuosa de PHA para obtener un contenido de sólido residual. A este contenido de sólido se añadió NaOH 5 M, y se llevó a cabo una reacción de hidrólisis a 95°C. Este líquido de hidrólisis se neutralizó con la cantidad equivalente de una solución acuosa de ácido acético al 60%, y se añadieron a la mezcla un tampón de acetato y una solución de ninhidrina para realizar una reacción de color a 100°C. La absorbancia de este líquido de la reacción de color se midió con un espectrofotómetro de haces proporcionales modelo U-1800 fabricado por Hitachi, Ltd. Al comparar esta absorbancia con una curva de calibración producida usando una muestra de leucina, se calculó la cantidad de nitrógeno orgánico en el contenido de sólidos. Se determinó la cantidad de nitrógeno orgánico en la suspensión acuosa de PHA (por peso de PHA) en términos de la cantidad de nitrógeno orgánico por peso del contenido de sólidos.

(Procedimiento para la determinación de la cantidad de nitrógeno orgánico en aglomerados de PHA (por peso de PHA))

**[0048]** A aglomerados de PHA se añadió NaOH 5 M, y se llevó a cabo una reacción de hidrólisis a 95°C. Este líquido de hidrólisis se neutralizó con la cantidad equivalente de una solución acuosa de ácido acético al 60%, y se añadieron a la mezcla un tampón de acetato y una solución de ninhidrina para realizar una reacción de color a 100°C. La absorbancia de este líquido de la reacción de color se midió con un espectrofotómetro de haces

proporcionales modelo U-1800 fabricado por Hitachi, Ltd. Al comparar esta absorbancia con una curva de calibración producida usando una muestra de leucina, se calculó la cantidad de nitrógeno orgánico en los aglomerados de PHA. Se determinó la cantidad de nitrógeno orgánico en los aglomerados de PHA (por peso de PHA) en términos de la cantidad de nitrógeno orgánico por peso de los aglomerados de PHA.

5

(Ejemplo 1) Preparación del líquido del cultivo celular

**[0049]** La cepa KNK-005 de *Ralstonia eutropha* descrita en el párrafo No. de la Publicación Internacional PCT No. 2008/010296 se cultivó de acuerdo con un procedimiento descrito en los párrafo Nos. [0050] - [0053] del mismo documento para obtener un líquido de cultivo celular que incluye los cuerpos celulares que contienen PHA. Cabe indicar que *Ralstonia eutropha* se clasifica como *Cupriavidus necator* en la actualidad.

10

(Ejemplo 2) Proceso de esterilización

**[0050]** El líquido del cultivo celular obtenido en el Ejemplo 1 se sometió a un tratamiento de calentamiento con agitación a una temperatura interna de 60 a 80°C durante 20 minutos para ejecutar un tratamiento de esterilización.

15

(Ejemplo 3)

**[0051]** Al líquido de cultivo celular esterilizado obtenido en el Ejemplo 2 se añadió dodecil sulfato de sodio al 0,2% en peso. Además, después de la adición de hidróxido de sodio de tal manera que el pH era de 11,0, la mezcla se incubó a 50°C durante 1 hora. A continuación, se llevó a cabo la rotura a alta presión con un homogeneizador a alta presión (modelo PA2K fabricado por Niro Soavi S.P.A.) a una presión de 450 a 550 kgf/cm<sup>2</sup>.

20

**[0052]** Al líquido de la rotura después de someterse a rotura a alta presión se añadió una cantidad igual de agua destilada. A continuación, el líquido de la rotura después de la rotura a alta presión se sometió a separación centrífuga, seguido de la eliminación del sobrenadante (concentrado x3). A la suspensión acuosa concentrada x3 de PHA se añadió agua en una cantidad igual al sobrenadante eliminado, seguido de la realización de la suspensión. A ésta se añadió dodecil sulfato de sodio al 0,2% en peso, y proteasa en una cantidad de 1/100 en peso de PHA (fabricada por Novozymes A/S, Esperasa), y la mezcla se agitó durante 2 horas mientras se mantiene el pH de 10 a 50°C. A continuación, la concentración de PHA se ajustó al 10% en peso. La cantidad de nitrógeno orgánico presente en la suspensión acuosa de PHA obtenida era de 3.415 ppm por peso de PHA.

25

30

**[0053]** El pH de esta suspensión acuosa de PHA se ajustó a 3, 4, 5, 6 o 7 con ácido sulfúrico, y la temperatura se ajustó a 30°C, 50°C o 70°C mientras se agitaba para producir la aglomeración. El período de tiempo de calentamiento fue de 60 min. El diámetro de partícula promedio en volumen de los aglomerados resultantes de este modo se determinó utilizando un analizador del tamaño de partícula (fabricado por Shimadzu Corporation, modelo SALD-300V). Los resultados se muestran en la Tabla 1. Por consiguiente, se demostró que el PHA tenía más probabilidades de agregarse incluso a temperaturas más bajas, ya que el pH de la suspensión acuosa de PHA era más fuertemente ácido.

35

40

Tabla 1

	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7
30°C	17,1 µm	14,5 µm	13,3 µm	3,3 µm	1,5 µm
50°C	30,2 µm	28,5 µm	30,5 µm	31,0 µm	1,5 µm
70°C	283,6 µm	280,1 µm	263,9 µm	241,3 µm	210,3 µm

(Ejemplo 4)

**[0054]** Al líquido de cultivo celular esterilizado obtenido en el Ejemplo 2 se añadió dodecil sulfato de sodio al 0,2% en peso. Además, después de la adición de hidróxido de sodio de tal manera que el pH era de 11,0, la mezcla se incubó a 50°C durante 1 hora. A continuación, se llevó a cabo la rotura a alta presión con un homogeneizador a alta presión (modelo PA2K fabricado por Niro Soavi S.P.A.) a una presión de 450 a 550 kgf/cm<sup>2</sup>.

45

50

**[0055]** Al líquido de la rotura después de someterse a rotura a alta presión se añadió una cantidad igual de agua destilada. A continuación, el líquido de la rotura después de la rotura a alta presión se sometió a separación centrífuga, seguido de la eliminación del sobrenadante (concentrado x2). A la suspensión acuosa concentrada x2 de PHA se añadió agua en una cantidad igual al sobrenadante eliminado, y la mezcla se sometió a separación centrífuga. Después de eliminar el sobrenadante, se añadió agua de nuevo, seguido de la realización de la suspensión. A ésta se añadió dodecil sulfato de sodio al 0,2% en peso, y proteasa en una cantidad de 1/100 en peso de PHA (fabricada por Novozymes A/S, Esperasa), y la mezcla se agitó durante 2 horas mientras se mantiene el pH de 10 a 50°C. A continuación, la concentración de PHA se ajustó al 10% en peso. La cantidad de nitrógeno orgánico presente en la suspensión acuosa de PHA obtenida era de 5.486 ppm por peso de PHA.

55

60

**[0056]** El pH de esta suspensión acuosa de PHA se ajustó a 4 con ácido sulfúrico, y la temperatura se ajustó a 70°C, mientras se agitaba para producir la aglomeración durante 30 minutos. El diámetro de partícula promedio en volumen de los aglomerados resultantes de este modo se determinó utilizando un analizador del tamaño de partícula (fabricado por Shimadzu Corporation, modelo SALD-300V). En consecuencia, significa el diámetro de partícula promedio en volumen antes de someterse a la operación de aglomeración fue de 1,5  $\mu\text{m}$ , mientras que el diámetro de partícula promedio en volumen después de la operación de aglomeración fue de 218,2  $\mu\text{m}$ . Además, los aglomerados obtenidos se lavaron con agua alcalina con un pH de 11,5 y metanol. La cantidad de nitrógeno orgánico de los aglomerados de PHA después del lavado fue de 426 ppm por PHA. Por consiguiente, se obtuvieron satisfactoriamente aglomerados de PHA que tenían una cantidad de nitrógeno orgánico no superior a 500 pm.

5

10

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Procedimiento para producir ácido poli-3-hidroxiálcanoico, comprendiendo el procedimiento ajustar el pH de una suspensión acuosa de ácido poli-3-hidroxiálcanoico para que caiga dentro de una región ácida mediante la adición de un ácido para obtener aglomerados de ácido poli-3-hidroxiálcanoico.
2. Procedimiento para producir ácido poli-3-hidroxiálcanoico, según la reivindicación 1, en el que la región ácida muestra un pH no superior a 6.
- 10 3. Procedimiento para producir ácido poli-3-hidroxiálcanoico, según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que la región ácida es una región de pH no inferior a 2.
4. Procedimiento para producir ácido poli-3-hidroxiálcanoico, según la reivindicación 3, en el que la región ácida es una región de pH no inferior a 3.
- 15 5. Procedimiento para producir ácido poli-3-hidroxiálcanoico, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la cantidad de nitrógeno orgánico presente en la suspensión acuosa de ácido poli-3-hidroxiálcanoico no es superior a 6.000 ppm por peso del ácido poli-3-hidroxiálcanoico.
- 20 6. Procedimiento para producir ácido poli-3-hidroxiálcanoico, según la reivindicación 4, en el que la cantidad de nitrógeno orgánico presente en la suspensión acuosa de ácido poli-3-hidroxiálcanoico no es superior a 4.000 ppm por peso del ácido poli-3-hidroxiálcanoico.
- 25 7. Procedimiento para producir ácido poli-3-hidroxiálcanoico, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el disolvente incluido en la suspensión acuosa de ácido poli-3-hidroxiálcanoico comprende agua, un disolvente orgánico que es miscible con agua, o un disolvente mixto de agua y el disolvente orgánico.
- 30 8. Procedimiento para producir ácido poli-3-hidroxiálcanoico, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el ácido poli-3-hidroxiálcanoico es un copolímero constituido por dos o más tipos de ácido 3-hidroxiálcanoico seleccionados del grupo que consiste en 3-hidroxiopropionato, 3-hidroxiбутirato, 3-hidroxiálcanoato, 3-hidroxihexanoato, 3-hidroxiheptanoato y 3-hidroxióctanoato.
- 35 9. Procedimiento para producir ácido poli-3-hidroxiálcanoico, según la reivindicación 8, en el que el ácido poli-3-hidroxiálcanoico es un copolímero binario de 3-hidroxihexanoato y 3-hidroxiбутirato, o un copolímero ternario de 3-hidroxihexanoato, 3-hidroxiбутirato y 3-hidroxiálcanoato.
- 40 10. Procedimiento para producir ácido poli-3-hidroxiálcanoico, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el ácido poli-3-hidroxiálcanoico es producido utilizando un microorganismo.
- 45 11. Procedimiento para producir ácido poli-3-hidroxiálcanoico, según la reivindicación 10, en el que el microorganismo es un microorganismo que pertenece al género *Aeromonas*, género *Alcaligenes*, género *Ralstonia*, o género *Cupriavidus*.
12. Procedimiento para producir ácido poli-3-hidroxiálcanoico, según la reivindicación 11, en el que el microorganismo es *Cupriavidus necator*.
13. Procedimiento para producir ácido poli-3-hidroxiálcanoico, según la reivindicación 10, en el que el microorganismo es un transformante.
- 50 14. Procedimiento para producir ácido poli-3-hidroxiálcanoico, según la reivindicación 13, en el que el microorganismo es un transformante en el que se introdujo al menos uno seleccionado entre un gen de la sintasa del ácido poli-3-hidroxiálcanoico derivado de *Aeromonas caviae* y una variante del mismo.

55