

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 647 611**

51 Int. Cl.:

C07C 67/08	(2006.01)	C12P 7/52	(2006.01)
C07C 67/333	(2006.01)	C12P 17/04	(2006.01)
C07C 69/54	(2006.01)	A45D 40/00	(2006.01)
C07C 69/56	(2006.01)		
C07D 309/30	(2006.01)		
C07D 305/12	(2006.01)		
C07D 307/33	(2006.01)		
C07D 319/12	(2006.01)		
C07D 407/04	(2006.01)		
C12P 7/62	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.02.2011 PCT/US2011/024620**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **18.08.2011 WO11100608**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.02.2011 E 11708606 (6)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.09.2017 EP 2534125**

54 Título: **Procedimiento para producir un acrilato de alquilo inferior y 2-buteno a partir de una biomasa genéticamente modificada de poli-3-hidroxibutirato**

30 Prioridad:

14.09.2010 US 382855 P
11.02.2010 US 303584 P
12.11.2010 US 413195 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.12.2017

73 Titular/es:

CJ CHEILJEDANG CORPORATION (100.0%)
CJ CheilJedang Center, 330 Dongho-ro, Jung-gu
Seoul 04560, KR

72 Inventor/es:

VAN WALSEM, JOHAN;
ANDERSON, ERIK;
LICATA, JOHN;
SPARKS, KEVIN, A.;
MIRLEY, CHRISTOPHER y
SIVASUBRAMANIAN, M., S.

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 647 611 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 un acrilato de alquilo inferior y 2-buteno a partir de una biomasa genéticamente modificada de poli-3-hidroxibutirato

Antecedentes de la invención

5 Los polímeros biodegradables, de base biológica tales como polihidroxialcanoatos (PHA), se producen naturalmente en sistemas de biomasa, tales como biomasa vegetal, biomasa microbiana (por ejemplo, bacterias que incluyen cianobacterias, levaduras, hongos) o biomasa de algas. Recientemente se han desarrollado sistemas de biomasa modificados genéticamente que producen una amplia variedad de polímeros y copolímeros de PHA biodegradables (Lee (1996), *Biotechnology & Bioengineering* 49: 1-14, Braunege et al., (1998), *J. Biotechnology* 65: 127- 161; Madison, LL y Huisman, GW (1999), *Metabolic Engineering of Poly-3-Hydroxyalkanoates; From DNA to Plastic*, en: *Microbial. Mol. Biol. Rev.* 63: 21-53).

15 También recientemente ha habido avances en el desarrollo de sistemas de biomasa que producen químicos "verdes" tales como 1,3-propanodiol (BioPDO® de Dupont), 1,4-butanodiol (Genomatica) y ácido succínico (Bioamber) para nombrar unos pocos. Análogamente a los polímeros de PHA de base biológica, estos productos químicos de base biológica han sido producidos por sistemas de biomasa modificados genéticamente que utilizan materias primas renovables, tienen menor huella de carbono y, según se informa, menores costos de producción en comparación con los métodos tradicionales de producción química a partir del petróleo. Sin embargo, una desventaja de producir directamente productos químicos a través de un bioprocedimiento es que los productos químicos a menudo son tóxicos para las células que los producen de modo que el rendimiento químico general de las células es bajo. Además, otros compuestos producidos por las células terminan como impurezas en los productos químicos de interés y, por lo tanto, se debe agregar una etapa de purificación al procedimiento, agregando un factor de costo adicional. Por lo tanto, existe la necesidad de superar las desventajas de la toxicidad celular y la pureza descritas anteriormente.

El documento WO 03/051813 A1 describe la preparación de ácidos alquenoicos tales como ácido acrílico y ácido crotonico por calentamiento de polihidroxialcanoatos.

25 Resumen de la invención y la divulgación adicional

Se ha encontrado que los productos químicos de base biológica (componentes monoméricos y derivados) pueden producirse de manera simple y económica mediante la descomposición térmica de la biomasa genéticamente modificada que contiene polihidroxialcanoatos (PHA) en presencia de un catalizador. Los huéspedes pueden modificarse genéticamente para producir polihidroxialcanoatos en sus células en cantidades y composiciones enriquecidas. Con la variedad de polímeros de PHA disponibles, se produce una amplia gama de productos químicos útiles e importantes de manera fácil y económica, a la vez que se superan los problemas de toxicidad y pureza celular. Los polímeros de PHA en la biomasa se degradan a componentes monoméricos y otros productos químicos modificados (por ejemplo, derivados) bajo condiciones que son eficientes en cuanto a costos y tiempo.

35 La presente descripción se refiere en general a métodos para producir componentes monoméricos de base biológica de alta pureza y alto rendimiento a partir de recursos de carbono renovables. Las ventajas de este procedimiento de biorrefinería son que utiliza una fuente de carbono renovable como materia prima, los huéspedes genéticamente modificados producen PHA con alto rendimiento sin efectos adversos para la célula huésped (lo que podría limitar la eficiencia del procedimiento) y cuando se combinan con catalizadores y se calientan son capaces de producir componentes monoméricos de base biológica y sus derivados con alto rendimiento y alta pureza.

40 En ciertas realizaciones, la presente descripción se refiere a métodos para producir un componente monomérico a partir de una biomasa de polihidroxialcanoato (PHA) modificado genéticamente, que comprende: calentar la biomasa en presencia de un catalizador para liberar un componente monomérico del PHA, en donde el rendimiento del componente monomérico es aproximadamente 70% con base en un gramo de monómero por gramo de polihidroxialcanoato.

45 En ciertas realizaciones, el polihidroxialcanoato es uno o más seleccionados de un poliglicólido, un poli-3-hidroxipropionato, un poli-3-hidroxibutirato, un poli-4-hidroxibutirato, un poli-5-hidroxivalerato, o un copolímero de los mismos. En algunas realizaciones, el componente monomérico es glicólido, 3-hidroxipropolactona, ácido acrílico, ácido crotonico, 5-hidroxivalerolactona o una mezcla de dos o más de los mismos. En algunas realizaciones, el componente monomérico contiene menos del 10% en peso de productos secundarios. En ciertas realizaciones, la biomasa es de un huésped recombinante seleccionado de un cultivo de planta, bacterias, una levadura, un hongo, un alga, una cianobacteria o una mezcla de dos o más de los mismos. En ciertas realizaciones, el huésped es bacteriano. En algunas realizaciones, la bacteria se selecciona de *Escherichia coli*, *Alcaligenes eutrophus* (renombrado como *Ralstonia eutropha*), *Bacillus spp.*, *Alcaligenes latus*, *Azotobacter*, *Aeromonas*, *Comamonas*, *Pseudomonas*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Klebsiella*), *Synechococcus sp* PCC7002, *Synechococcus sp.* PCC 7942, *Synechocystis sp.* PCC 6803, *Thermosynechococcus elongatus* BP-I, *Chlorobium tepidum*, *Chloroflexus auranticus*, *Chromatium tepidum*, *Chromatium vinosum*, *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodobacter capsulatus* y *Rhodopseudomonas palustris*. En otras realizaciones, el huésped es un cultivo vegetal. En algunas realizaciones, el cultivo vegetal se selecciona de tabaco, caña de azúcar, maíz, pasto varilla, sorgo miscanthus, sorgo dulce, o una mezcla de dos o más de los mismos. En otras realizaciones, el huésped es un alga recombinante seleccionada entre *Chlorella minutissima*, *Chlorella emersonii*, *Chlorella sorokiniana*,

Chlorella ellipsoidea, *Chlorella* sp., o *Chlorella protothecoides*. En ciertas realizaciones, la biomasa genéticamente modificada tiene una mayor cantidad de producción de PHA en comparación con el organismo de tipo natural.

5 En ciertas realizaciones de los métodos descritos en la presente memoria, el calentamiento incluye pirólisis, torrefacción o pirólisis instantánea. En algunas realizaciones, el calentamiento es a una temperatura de aproximadamente 200°C hasta aproximadamente 350°C. En otras realizaciones, la biomasa se seca antes del calentamiento. En aún otras realizaciones, el secado es a una temperatura de 100°C hasta 175°C. En ciertas realizaciones, la biomasa seca tiene un contenido de agua de 5% en peso, o menos. En ciertas realizaciones, el calentamiento es de aproximadamente 1 minuto hasta aproximadamente 30 minutos o de 1 minuto hasta aproximadamente 2 minutos.

10 En ciertas realizaciones, los métodos comprenden además recuperación del componente monomérico, por ejemplo, condensación u otros métodos de recuperación.

En otras realizaciones, el catalizador es un catalizador metálico o un catalizador orgánico. En algunas realizaciones, el catalizador es de 4% a 15% en peso.

15 En otro aspecto, los métodos de la presente divulgación incluyen secado de una biomasa (por ejemplo, biomasa genéticamente modificada), que comprende PHA, calentamiento de la biomasa seca a 200-350°C para producir componentes monoméricos y luego modificar los productos monoméricos por hidrogenación directa, esterificación y/o amidación para producir los dioles, ésteres de hidroxilo o amidas correspondientes. Por ejemplo, cuando una biomasa comprende poli-3HB, el componente monomérico, ácido crotonico, puede modificarse adicionalmente hasta otros productos de cuatro carbonos (productos C4, por ejemplo, derivados) que incluyen, pero no se limitan a, ácido fumárico, buteno, anhídrido maleico (MAN), 2-propileno, ácido acrílico y similares. Del mismo modo, cuando una biomasa comprende 3-hidroxipropionato (3HP), el componente monomérico, β-propiolactona, puede modificarse hasta otros productos de tres carbonos (productos C3, por ejemplo, derivados) tales como ácido acrílico, acrilato de metilo, acrilamida, acrilonitrilo, 3-hidroxipropionato de etilo, ácido malónico y similares. La biomasa que comprende poli-5-hidroxisvalerato para producir δ-valerolactona también se puede modificar a otros productos de cinco carbonos (C5) (por ejemplo, derivados).

25 En algunas realizaciones, se describen los métodos para producir ácido crotonico a partir de una biomasa de polihidroxicanoato (PHA) genéticamente modificada. Estos métodos incluyen calentamiento de la biomasa en presencia de un catalizador para liberar el componente de ácido crotonico a partir del PHA, en donde el rendimiento del monómero es de aproximadamente 70% con base en un gramo de monómero por gramo de polihidroxicanoato, haciendo reaccionar el ácido crotonico formando un éster de alquilo crotonato inferior; y haciendo reaccionar el éster de crotonato de alquilo inferior (por ejemplo, butilo) en condiciones adecuadas para formar un acrilato de alquilo inferior y un 2-buteno mediante metátesis cruzada en presencia de un primer catalizador con una cantidad suficiente de propileno. El propileno se puede formar a partir de una reacción de metátesis de etileno y 2-buteno en presencia de un segundo catalizador y el exceso de propileno se elimina continuamente. El éster de crotonato de alquilo inferior puede reaccionar adicionalmente en presencia de un segundo catalizador para formar un alcohol.

35 En ciertos aspectos, el primer catalizador es un catalizador de metátesis (por ejemplo, un catalizador de metátesis cruzada de Hoveyda-Grubb, 1,3-bis(2,4,6-trimetilfenil)-2-imidazolidinilidenciloro(o-isopropoxifenilmetileno)rutenio o similares). En otros aspectos, el primer catalizador no está expuesto a etileno. En ciertos aspectos, el segundo catalizador es un catalizador de metátesis.

40 En otras realizaciones, los métodos para producir ácido crotonico a partir de una biomasa de polihidroxicanoato (PHA) genéticamente modificada incluye el calentamiento de la biomasa en presencia de un catalizador para liberar un componente de ácido crotonico del PHA, en donde el rendimiento del componente de ácido crotonico es aproximadamente de 70% con base en un gramo de monómero por gramo de polihidroxicanoato que reacciona con el ácido crotonico para formar un éster de crotonato de butilo e hidrogenar el éster de crotonato de butilo para formar dos moles de butanol. En ciertas realizaciones, los métodos incluyen producir una 3-hidroxipropiolactona a partir de una biomasa de polihidroxicanoato (PHA) modificado genéticamente, que comprende el calentamiento de la biomasa en presencia de un catalizador, por ejemplo, carbonato de sodio sulfato ferroso heptahidratado para liberar un componente monomérico del PHA, en donde el rendimiento del componente monomérico es de aproximadamente 70% con base en un gramo del componente monomérico por gramo de polihidroxicanoato y se forma ácido acrílico. En algunas realizaciones, se proporcionan métodos para producir ácido crotonico a partir de una biomasa de polihidroxicanoato (PHA) genéticamente modificada, que comprende el calentamiento de la biomasa en presencia de un catalizador para liberar el componente de ácido crotonico del PHA, en donde el rendimiento del monómero es de aproximadamente 70% con base en un gramo de monómero por gramo de polihidroxicanoato y el ácido crotonico se modifica adicionalmente a ácido fumárico, buteno, anhídrido maleico (MAN), 2-propileno o ácido acrílico.

55 En algunas realizaciones, el catalizador es un catalizador metálico. En ciertas realizaciones, el catalizador es un compuesto de cloruro, óxido, hidróxido, nitrato, fosfato, sulfonato, carbonato o estearato que contiene un ion metálico que es aluminio, antimonio, bario, bismuto, cadmio, calcio, cerio, cromo, cobalto, cobre, galio, hierro, lantano, plomo, litio, magnesio, molibdeno, níquel, paladio, potasio, plata, sodio, estroncio, estaño, tungsteno, vanadio o cinc o mezclas de los mismos. En algunas realizaciones, el catalizador es un catalizador orgánico que es una amina, azida, enol, glicol, sal de amonio cuaternario, fenóxido, cianato, tiocianato, dialquilamida y tiolato de alquilo o mezclas de los mismos. En

ciertas realizaciones, el catalizador es hidróxido de calcio, sulfato ferroso heptahidratado o carbonato de sodio o una mezcla de estos. En ciertas realizaciones, el catalizador es un lecho de catalizador fijo que consiste en gránulos de alúmina de 1/8 impregnados con pentóxido de vanadio o compuestos similares.

5 En otro aspecto, la presente divulgación se refiere además a un procedimiento de biorrefinería continua para la producción de ácido acrílico a partir de una biomasa de PHA utilizando un protocolo de reacción de catálisis en tándem múltiple, que comprende: cultivar una biomasa de PHA genéticamente modificada para producir poli-3-hidroxitirato, pirolizar el poli-3-hidroxitirato para producir ácido crotonico, hacer reaccionar el ácido crotonico para formar un éster de crotonato de alquilo inferior en presencia de un catalizador de transesterificación; y hacer reaccionar el éster de crotonato de alquilo inferior en condiciones adecuadas para formar un acrilato de alquilo inferior y 2-buteno mediante metátesis cruzada en presencia de un primer catalizador de metátesis con una cantidad suficiente de propileno, en donde el propileno se forma a partir de una reacción de metátesis de etileno y 2-buteno en presencia de un segundo catalizador de metátesis y el exceso de propileno se elimina continuamente.

10 En otra realización, la presente descripción se refiere a un procedimiento continuo de biorrefinería para la producción de ácido acrílico a partir de una biomasa de PHA genéticamente modificada que comprende, cultivar la biomasa de PHA genéticamente modificada para producir poli-3-hidroxiacetato, calentando el poli-3-hidroxiacetato con un catalizador para producir ácido acrílico y recuperar el ácido acrílico. En otra realización más, la invención se refiere a un procedimiento continuo de biorrefinería para la producción de glicólido a partir de una biomasa de PHA genéticamente modificada que comprende cultivar la biomasa de PHA genéticamente modificada para producir poliglicólido, calentando el poliglicólido con un catalizador para producir un componente monomérico de glicólido y recuperar el monómero de glicólido. Un procedimiento continuo de biorrefinería para la producción de 5-hidroxi-valerolactona a partir de una biomasa de PHA genéticamente modificada que comprende, cultivar la biomasa de PHA genéticamente modificada para producir poli-5-hidroxi-valerolactona, calentando la poli-5-hidroxi-valerolactona con un catalizador para producir un monómero de 5-hidroxi-valerolactona y recuperar el monómero de 5-hidroxi-valerolactona.

15 En los procedimientos de biorrefinería continua, el cultivo es continuo, y las otras etapas en cada realización descrita (por ejemplo, calentamiento, reacción, etc.) se realizan continuamente de acuerdo con procedimientos de fabricación estándar.

20 En ciertas realizaciones, la recuperación del componente monomérico incluye condensar el componente monomérico. Como se usa en la presente memoria, el término "recuperación" tal como se aplica al componente monomérico significa aislarlo de los materiales de biomasa, por ejemplo, incluyendo, pero sin limitarse a: recuperación por condensación, metodologías de separación, tales como el uso de membranas, separación de la fase gaseosa (por ejemplo, vapor), tal como destilación, y similares. Por lo tanto, la recuperación puede lograrse a través de un mecanismo de condensación que captura el vapor del componente monomérico, condensa el vapor del componente monomérico a una forma líquida y lo transfiere lejos de los materiales de biomasa.

25 En otro aspecto, se proporciona un procedimiento que incluye el secado de hojas de pasto varilla (por ejemplo, hojas de pasto varilla genéticamente modificada), que incluyen poli-3-hidroxiacetato a una temperatura de 100°C a 175°C para proporcionar hojas de pasto varilla secas que tienen un contenido de agua de 5% en peso, o menos; calentamiento de las hojas de pasto varilla secas a una temperatura de 200°C a 350°C durante un período de tiempo suficiente para descomponer el poli-3-hidroxiacetato y liberar ácido acrílico, y producir biomasa residual; recuperación del ácido acrílico; y torrefacción de la biomasa residual. En algunas realizaciones, el período de tiempo es de 1 minuto a 5 minutos. En otras realizaciones, el período de tiempo es de 1 minuto a 2 minutos. En algunas realizaciones, la recuperación del ácido acrílico incluye condensación del ácido acrílico. En algunas realizaciones, la torrefacción incluye mantener una temperatura de la biomasa residual a 200°C a 350°C. En ciertas realizaciones, la torrefacción incluye mantener la temperatura durante un período de tiempo de 10 minutos a 30 minutos. En algunas realizaciones, los procedimientos descritos también incluyen añadir un catalizador a la biomasa antes del calentamiento. En ciertas realizaciones, el catalizador es un catalizador metálico.

30 En otro aspecto, se proporciona un procedimiento que incluye secar hojas de tabaco (por ejemplo, hojas de tabaco genéticamente modificadas), que incluyen poli-3-hidroxitirato a una temperatura de 100°C a 175°C para proporcionar hojas de tabaco secas que tienen un contenido de agua de 5% en peso, o menos; calentar las hojas de tabaco secas a una temperatura de 200°C a 350°C durante un período de tiempo suficiente para descomponer el poli-3-hidroxitirato y liberar una mezcla de ácido crotonico cis y trans, y producir una biomasa residual; recuperar el ácido crotonico cis y trans; y torrefacción de la biomasa residual. En algunas realizaciones, el período de tiempo es de 1 minuto a 10 minutos o de 1 minuto a 5 minutos o de 1 minuto a 2 minutos o periodos de tiempo entre estos tiempos. En algunas realizaciones, la recuperación del ácido crotonico cis y trans incluye la condensación del ácido crotonico cis y trans. En algunas realizaciones, la torrefacción incluye mantener una temperatura de la biomasa residual a 200°C a 350°C. En algunas realizaciones, la torrefacción incluye mantener la temperatura durante un período de tiempo de 10 minutos a 30 minutos (o periodos de tiempo entre estos tiempos). En algunas realizaciones, el procedimiento también incluye añadir un catalizador a la biomasa antes del calentamiento. En ciertas realizaciones, el catalizador es un catalizador metálico.

35 En otro aspecto, se proporciona un procedimiento que incluye tratar una biomasa (por ejemplo, biomasa genéticamente modificada), que incluye un PHA en un procedimiento lignocelulósico para producir azúcares fermentables; secar la biomasa para proporcionar una biomasa seca que tiene un contenido de agua de 5% en peso, o menos; calentar la

- 5 biomasa a una temperatura de 200°C a 350°C durante un período de tiempo suficiente para descomponer el PHA y liberar un componente monomérico, y producir una biomasa residual; recuperar el componente monomérico y usar la biomasa residual como combustible. En algunas realizaciones, el procedimiento incluye además recuperar los azúcares fermentables. En algunas realizaciones, el procedimiento también incluye añadir un catalizador a la biomasa antes del calentamiento. En ciertas realizaciones, el catalizador es un catalizador metálico.
- La biomasa de PHA se ha modificado genéticamente para aumentar el rendimiento de PHA sobre la biomasa de tipo natural, luego la biomasa se trata para producir productos intermedios versátiles que pueden procesarse adicionalmente para producir productos deseados, especializados y básicos.
- 10 En ciertas realizaciones, la producción de biomasa usa reacciones múltiples de catálisis en tándem. La utilización de materias primas renovables a partir de biomasa de PHA para generar productos deseables, por ejemplo, ácidos acrílicos, se ajusta a los principios de la tecnología ecológica sin las desventajas de utilizar materias primas de petróleo.
- La invención para la que se reivindica protección se refiere a un método para producir un acrilato de alquilo inferior y 2-buteno a partir de una biomasa de poli-3-hidroxitbutirato genéticamente modificada como se define en la reivindicación 1.
- Breve descripción de los dibujos
- 15 Lo anterior será evidente a partir de la siguiente descripción más particular de realizaciones que sirven de ejemplo de la presente descripción, tal como se ilustra en los dibujos adjuntos en los que los mismos caracteres de referencia se refieren a las mismas partes a lo largo de las diferentes vistas. Los dibujos no son necesariamente a escala, sino que se hace énfasis en ilustrar realizaciones de la presente descripción.
- 20 La Figura 1 es un esquema de la recuperación de PHA de la biomasa con el residuo convertido en combustible sólido, de acuerdo con diversas realizaciones.
- La Figura 2 es un cromatograma de gases de tabaco + P3HB (10% en peso) pirolizado a 350°C, de acuerdo con una realización.
- La Figura 3 es un cromatograma de gases de tabaco + P3HB (10% en peso) + cal (5% en peso) pirolizado a 350°C, de acuerdo con una realización.
- 25 La Figura 4 es un diagrama de flujo del proceso para la producción de ácido acrílico de base biológica a partir de biomasa + P3HB usando catalizadores de metátesis, de acuerdo con una realización.
- La Figura 5 es un diagrama de flujo del proceso para la esterificación e hidrogenación de ácido crotonico, de acuerdo con una realización.
- 30 La Figura 6 es un diagrama de flujo del proceso para la oxidación de ácido crotonico hasta anhídrido maleico (MAN), de acuerdo con una realización.
- La Figura 7 es un cromatograma de gases de biomasa microbiana seca + P5HV pirolizada a 300°C, de acuerdo con una realización.
- La Figura 8 es un cromatograma de gases de biomasa microbiana seca + P5HV + cal (5% en peso) pirolizada a 300°C, de acuerdo con una realización.
- 35 La Figura 9 es un cromatograma de gases de pasto varilla seco + P3HP pirolizado a 300°C, de acuerdo con una realización.
- La Figura 10 es un cromatograma de gases de pasto varilla seco + P3HP + FeSO₄ · 7 H₂O (5% en peso) pirolizado a 300°C, de acuerdo con una realización.
- 40 La Figura 11 es un cromatograma de gases de pasto varilla seco + P3HP + Na₂CO₃ (5% en peso) pirolizada a 300°C, de acuerdo con una realización.
- La Figura 12 es un esquema del ciclo catalítico para la autometátesis de propileno para producir 2-buteno y etileno.
- Descripción detallada de la invención y la divulgación adicional
- Sigue una descripción de ejemplos de realizaciones de la presente descripción.
- 45 En general, la presente descripción se refiere a la producción de productos químicos especializados y básicos a partir de biomasa de polímeros de polihidroxialcanoato modificados genéticamente en condiciones controladas. Se describen en la presente memoria métodos para obtener productos químicos a partir de biomasa que contiene PHA. En un aspecto, la biomasa ha sido genéticamente modificada para producir PHA que está a una concentración o cantidad mayor que el PHA que se presenta naturalmente en la biomasa de tipo natural. El organismo huésped ha sido genéticamente modificado mediante la introducción de genes y/o supresión de genes en un productor de PHA de tipo natural o genéticamente modificado que crea cepas que sintetizan PHA a partir de materias primas de bajo costo. La
- 50

biomasa de PHA se produce en un procedimiento de fermentación donde el microbio modificado genéticamente se alimenta con un sustrato renovable. Los sustratos renovables incluyen materias primas de fermentación tales como azúcares, aceites vegetales, ácidos grasos o gas de síntesis producido a partir de material vegetal. El nivel de PHA producido en la biomasa del sustrato de azúcar es mayor al 10% (por ejemplo, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% u 80%). El enriquecimiento del PHA permite aumentos directos de los productos de PHA de partida y la conversión a componentes monoméricos para su posterior procesamiento en otros productos de reacción. En otra realización, la biomasa ha sido genéticamente modificada para producir un PHA con ciertos componentes monoméricos. En ciertos aspectos, estos componentes monoméricos son intermedios para el procesamiento adicional con otros productos de reacción o componentes monoméricos, por ejemplo, componentes monoméricos que son productos químicos de materias primas.

En otro aspecto, se proporciona un método para convertir un PHA en una biomasa seca que contiene PHA (por ejemplo, biomasa genéticamente modificada) en componentes monoméricos, tales como lactonas, glicólidos y ácidos orgánicos que se recuperan como productos químicos de materia prima y se usan en otros procedimientos o reacciones. En ciertas realizaciones, este procedimiento se integra con un procedimiento de torrefacción mediante el cual la biomasa residual continúa siendo tratada térmicamente una vez que los intermedios químicos volátiles se han liberado para proporcionar un material combustible. Los materiales combustibles producidos por este procedimiento se usan para la combustión directa o se tratan adicionalmente para producir líquidos de pirólisis o gas de síntesis. En general, el procedimiento tiene la ventaja adicional de que la biomasa residual se convierte en un combustible de mayor valor que luego puede usarse para la producción de electricidad y vapor para proporcionar energía para el procedimiento, eliminando así la necesidad de tratamiento de residuos.

Aunque se sabe que los polihidroxialcanoatos (PHA) son térmicamente inestables en su forma pura, se encontró sorprendentemente que cuando los PHA están presentes en biomasa en una forma no purificada, se pueden convertir en productos químicos intermedios de molécula pequeña, es decir, componentes monoméricos que tienen de 3 a 6 átomos de carbono, con alto rendimiento (por ejemplo, hasta aproximadamente 70%, aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, aproximadamente 95%) y sorprendentemente alta pureza (por ejemplo, desde aproximadamente 95% hasta aproximadamente 100%). Al calentar la biomasa a una temperatura predeterminada durante un corto período de tiempo, puede efectuarse la conversión del PHA en los intermedios químicos. Los componentes monoméricos son luego recuperados y su valor se explota. Sin embargo, queda una cantidad significativa de una biomasa residual del procedimiento. Como se usa en este documento, el término "biomasa residual" se refiere a la biomasa después de la conversión de PHA a los compuestos intermedios de molécula pequeña. La biomasa residual puede convertirse a través de la torrefacción en un combustible utilizable, reduciendo así el desperdicio de la producción de PHA y obteniendo productos químicos básicos valiosos adicionales de los procedimientos de torrefacción típicos. Como se indicó anteriormente, la torrefacción se realiza a una temperatura que es suficiente para densificar la biomasa residual.

En la presente tecnología, se ha encontrado que cuando la temperatura de torrefacción se mantiene durante un corto período de tiempo (por ejemplo, en un período de tiempo de 1-5 minutos), los componentes monoméricos de un PHA contenido dentro de la biomasa pueden recogerse con alto rendimiento y pureza. Por lo tanto, en algunas realizaciones, después del secado de la biomasa para formar una biomasa seca, la biomasa seca se calienta a una temperatura entre aproximadamente 200°C hasta aproximadamente 350°C durante un corto período de tiempo. En algunas realizaciones, el corto período de tiempo es de 1 minuto a 5 minutos. En otras realizaciones, el corto período de tiempo es de 1 minuto a 2 minutos, o menos de un minuto (por ejemplo, 55 segundos, 50 segundos, 45 segundos, 40 segundos o menos) o de 1 minuto a 4 minutos o de 2 minutos a 5 minutos, o de 3 minutos a 5 minutos o de 2 minutos a 5 minutos, o en algunas realizaciones de 5 minutos a 10 minutos. La temperatura está a una temperatura de aproximadamente 200°C hasta aproximadamente 350°C e incluye temperaturas entre, por ejemplo, aproximadamente 205°C, aproximadamente 210°C, aproximadamente 220°C, aproximadamente 230°C, aproximadamente 240°C, aproximadamente 250°C, aproximadamente 260°C, aproximadamente 270°C, aproximadamente 280°C, aproximadamente 290°C, aproximadamente 300°C, aproximadamente 310°C, aproximadamente 320°C, aproximadamente 330°C, aproximadamente 340°C, aproximadamente 345°C, así como las temperaturas entre estas temperaturas.

Estas observaciones sorprendentes permiten una separación temporal de la conversión rápida de PHA a una temperatura de, a o entre aproximadamente 200°C hasta aproximadamente 350°C para producir los componentes monoméricos seguido por torrefacción lenta a aproximadamente 200°C hasta aproximadamente 350°C para producir un combustible sólido. Por lo tanto, los componentes monoméricos se recuperan y su valor se explota y la biomasa se puede convertir en combustibles sólidos valiosos que se recuperan.

Alternativamente, también se ha encontrado que la biomasa (por ejemplo, biomasa genéticamente modificada) que contiene el PHA, puede secarse primero y el PHA convertido a los componentes monoméricos en una pirólisis instantánea, a alta temperatura, con la recuperación de los componentes monoméricos, y el sometimiento de la biomasa residual a altas temperaturas para la conversión en combustibles sólidos. La pirólisis instantánea y de alta temperatura se realiza a temperaturas superiores a 500°C (por ejemplo, aproximadamente 510°C, aproximadamente 520°C, aproximadamente 530°C, aproximadamente 540°C, aproximadamente 550°C, aproximadamente 560°C, aproximadamente 570°C, aproximadamente 580°C, aproximadamente 590°C, aproximadamente 600°C, aproximadamente 610°C, aproximadamente 620°C, aproximadamente 630°C, aproximadamente 640°C, aproximadamente 650°C, aproximadamente 660°C, aproximadamente 670°C, aproximadamente 680°C,

aproximadamente 690°C, aproximadamente 700°C, aproximadamente 710°C, aproximadamente 720°C, aproximadamente 730°C, aproximadamente 740°C, aproximadamente 750°C, aproximadamente 760°C, aproximadamente 770°C, aproximadamente 780°C, aproximadamente 790°C, aproximadamente 800°C, o mayor a aproximadamente 800°C) con un tiempo de permanencia suficiente para descomponer al menos una porción de la biomasa en líquidos de pirólisis y una biomasa pirolizada. En algunas realizaciones, el tiempo de permanencia es de 1 segundo a 15 segundos, o de 5 segundos a 20 segundos. En otras realizaciones, los tiempos de permanencia son de 1 segundo a 5 segundos, o menos de 5 segundos. La temperatura y el tiempo se pueden optimizar para cada producto o componente monomérico. Otros productos del procedimiento de pirólisis instantánea incluyen otros gases ligeros que pueden recolectarse y recuperarse, o pueden quemarse como combustible, proporcionando vapor del proceso y/o calor durante todo el procedimiento.

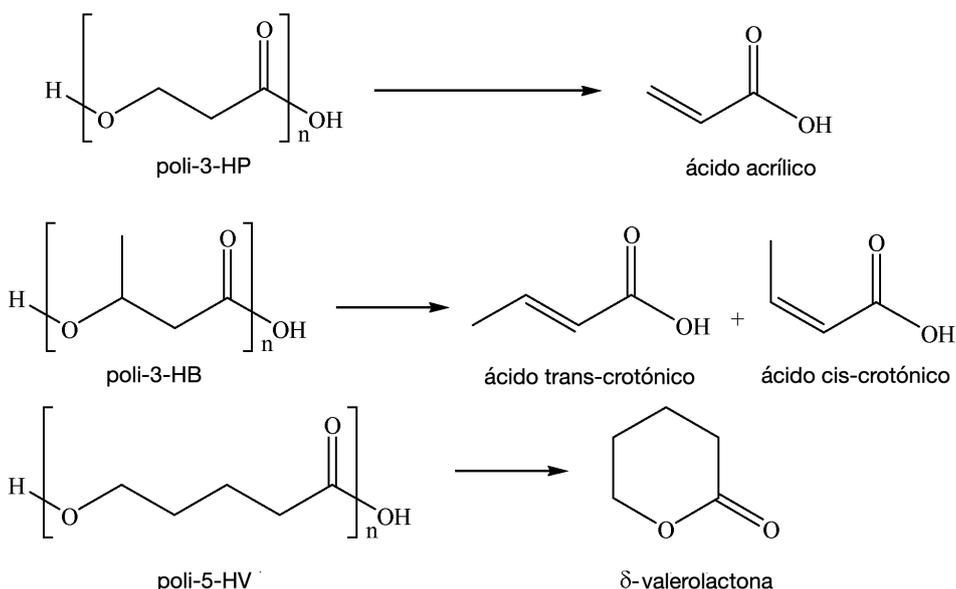
Un procedimiento para recuperar intermedios químicos con base en PHA a partir de biomasa se expresa esquemáticamente en la Figura 1, como un procedimiento de diagrama de flujo no limitante. La Figura 1 describe un sistema de recuperación integrado de PHA a partir de una biomasa con biomasa residual convertida en combustibles.

De acuerdo con algunas realizaciones, los PHA son aquellos que proporcionarán una serie de componentes monoméricos que pueden recuperarse fácilmente a bajo costo y de manera eficiente en cuanto a energía, sin la separación previa del PHA de la biomasa. Los materiales adecuados de PHA son aquellos que se forman por la polimerización intracelular de uno o más componentes monoméricos. Los componentes monoméricos adecuados de los PHA incluyen, pero no se limitan a, 3-hidroxi butirato, 3-hidroxi propionato, 3-hidroxi valerato, 3-hidroxi hexanoato, 3-hidroxi heptanoato, 3-hidroxi octanoato, 3-hidroxi nonanoato, 3-hidroxi decanoato, 3-hidroxi dodecanoato, 3-hidroxi dodecenoato, 4-hidroxi butirato, 4-hidroxi valerato, 5-hidroxi valerato y 6-hidroxi hexanoato. Tales componentes monoméricos pueden formar homopolímeros o copolímeros.

En algunas realizaciones, el PHA es un homopolímero. Como se usa en el presente documento, el término "homopolímero" se refiere a un polímero en el que existe un único componente monomérico presente en el polímero. Los ejemplos de homopolímeros de PHA incluyen, pero no se limitan a, poli-3-hidroxi propionato (poli-3HP), poli-3-hidroxi butirato (poli-3HB), poli-4-hidroxi butirato (poli-4HB), poli-5-hidroxi pentanoato, poli-6-hidroxi hexanoato, ácido poliláctico y ácido poliglicólico.

En otras realizaciones, el PHA es un copolímero. Tal como se usa en el presente documento, el término "copolímero" se refiere a un polímero que contiene dos, o más, componentes monoméricos diferentes. Los ejemplos de copolímeros de PHA incluyen poli-3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi propionato, poli-3-hidroxi butirato-co-(D)-láctido, poli-3-hidroxi butirato-co-4-hidroxi butirato (poli-3HB-co-4HB), poli-3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi valerato (poli-3HB-co-3HV), poli-3-hidroxi butirato-co-5-hidroxi valerato y poli-3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi hexanoato. En algunas realizaciones, cuando el PHA es un copolímero, la relación del primer comonomero al segundo comonomero puede ser del 3% al 97% en peso. Aunque se han proporcionado ejemplos de copolímeros de PHA que tienen dos componentes monoméricos diferentes, el PHA puede tener más de dos componentes monoméricos diferentes (por ejemplo, tres componentes monoméricos diferentes, cuatro componentes monoméricos diferentes, cinco componentes monoméricos diferentes, etc.).

Los componentes monoméricos que se recuperan de la conversión de PHA son únicos para cada polímero de PHA particular. Las reacciones de degradación típicamente favorecen la eliminación β para producir un ácido alquenoico insaturado, o la despolimerización para formar lactonas que corresponden al inverso de una polimerización de apertura de anillo. Las reacciones de descomposición térmica típicas se muestran a continuación como varios ejemplos no limitantes:



Los ácidos alquenoicos insaturados y las lactonas pueden ser luego convertidas (por ejemplo, modificadas) por medios catalíticos convencionales para producir productos derivados adicionales.

5 Por lo tanto, de acuerdo con una realización, se proporciona un procedimiento que incluye secado de microbios o de biomasa vegetal que contiene un nivel adecuado de un PHA; opcionalmente la adición de un catalizador adecuado; el secado de la biomasa para formar una biomasa seca que tiene un bajo contenido de humedad; el calentamiento de la biomasa seca hasta un intervalo de temperatura entre aproximadamente 200°C hasta aproximadamente 350°C durante un período de aproximadamente 1-5 minutos. Esto da como resultado una descomposición controlada del PHA hasta los componentes monoméricos como una fase de vapor que luego puede ser recuperada mediante condensación. Después de descomponer el PHA, la biomasa residual se puede alimentar a un reactor de torrefacción que opera a una temperatura de aproximadamente 200°C hasta aproximadamente 350°C (o una temperatura entre estas temperaturas, tales como las descritas en la presente memoria) con un tiempo de permanencia entre aproximadamente 10 hasta aproximadamente 30 minutos para producir una biomasa torrefactada y gases residuales livianos (combustible). Los gases no condensables de la descomposición del PHA se alimentan al reactor de torrefacción para su recuperación como combustible.

15 Según otra realización, después de que el PHA se descompone como se describió anteriormente, la biomasa residual se alimenta a un reactor de pirólisis rápida a alta temperatura que típicamente opera a una temperatura de aproximadamente 500°C, o mayor, con un tiempo de permanencia de 1 segundo a 15 segundos para producir aceites de pirólisis líquidos condensables y gases ligeros no condensables que se recuperan para combustible, y una biomasa carbonizada que también se puede usar como combustible sólido. En algunas realizaciones, el exceso de calor de la pirólisis rápida a alta temperatura se usa para calentar el reactor de descomposición de PHA a temperatura más baja. Tal integración de todas las etapas en un proceso puede dar como resultado una alta eficiencia energética general para el procedimiento.

25 De acuerdo con otra realización, una biomasa que contiene PHA se trata mediante procedimientos lignocelulósicos estándar para producir azúcares fermentables y una fracción rica en lignina de la biomasa. Dichos procedimientos lignocelulósicos utilizan ácidos diluidos y tratamiento enzimático de la biomasa. Debido a que varios PHA son típicamente resistentes al ácido diluido y al tratamiento enzimático, los PHA permanecen en gran medida en la biomasa residual después de dicho tratamiento. Como es típico en las instalaciones lignocelulósicas, la biomasa rica en lignina residual se seca para usarse como combustible. Sin embargo, de acuerdo con la realización, antes de alimentar la biomasa rica en lignina a una planta generadora de energía o vapor, el PHA se recupera por descomposición térmica de aproximadamente 200°C hasta aproximadamente 350°C (o una temperatura entre estas temperaturas, tal como las descritas en este documento) con un tiempo de permanencia de aproximadamente 1-5 minutos (o menos, o un tiempo de permanencia entre estos tiempos, como los descritos en este documento), produciendo los componentes monoméricos de PHA correspondientes, y una segunda biomasa rica en lignina reducida. La biomasa rica en lignina reducida del reactor puede alimentarse directamente a las calderas, o, alternativamente, procesarse adicionalmente para producir biomasa torrefactada o aceites de pirólisis. Dicha integración de calor puede usarse con plantas de generación de energía o vapor que utilizan combustibles de biomasa y son posibles usando técnicas de ingeniería estándar de integración de procedimientos.

35 En realizaciones previas, se describió la conversión de PHA en productos químicos correspondientes de interés por degradación a baja temperatura. Por ejemplo, el poli-3HP se puede convertir directamente en ácido acrílico mediante termólisis usando un catalizador diferente.

40 En otra realización, también es posible someter los productos químicos de PHA generados a partir de la termólisis directamente a condiciones de hidrogenación, esterificación o amidación para producir los dioles, ésteres hidroxílicos y amidas correspondientes. Por ejemplo, poli-3HB produce butanol o anhídrido maleico cuando se somete a hidrogenación con H₂ u oxidación, respectivamente. Un problema importante con la conversión directa de biomasa que contiene PHA a través de medios químicos es el potencial de reacciones secundarias con lípidos, azúcares y proteínas de la biomasa que desperdician reactivos caros y dan como resultado una pobre selectividad y pureza. Sin embargo, será necesario desarrollar nuevas configuraciones de reactor para manejar las materias primas de biomasa a diferencia de las materias primas líquidas o gaseosas convencionales. Por lo tanto, sería de gran beneficio aislar primero el PHA como una molécula pequeña que luego se puede convertir en una variedad de productos químicos corriente abajo usando catalizadores y reactores convencionales de hidrogenación, esterificación y amidación.

45 El procesamiento de grasas y aceites para producir alcoholes proporciona alguna orientación a este respecto. Los aceites y las grasas son fuentes significativas de alcoholes grasos que se usan en una variedad de aplicaciones tales como lubricantes y surfactantes. Las grasas no son típicamente hidrogenadas directamente ya que las condiciones intensivas de reacción tienden a degradar el glicerol a alcoholes inferiores tales como propilenglicol y propanol durante el curso de la hidrogenación. Por esta razón, es más convencional hidrolizar primero el aceite y luego purificar previamente los ácidos grasos para permitir una hidrogenación más eficiente (véase, por ejemplo, el procedimiento de hidrogenación de Lurgi en Bailey's Industrial Oil and Fat Products, sexta edición, volumen seis. Editado por Fereidoon Shahidi, John Wiley & Sons, Inc. 2005).

50 El poli-3HB (poli-3-hidroxibutirato) es el PHA más simple que se encuentra en la naturaleza y se convierte en ácido crotónico cuando se somete a termólisis a 250-350°C. Durante esta reacción, se forman varios isómeros que no se

separan fácilmente (ácido crotonico trans, cis e iso). El ácido crotonico tiene algunos usos especiales, pero no es una materia prima química importante. De hecho, el crotonaldehído se produjo históricamente (a través de condensación aldólica de acetaldehído) como materia prima primaria para la producción de butanol. Solo cantidades menores de crotonaldehído se convirtieron en ácido crotonico a pesar de ser una conversión directa.

- 5 Usando una conversión altamente selectiva de poli-3HB en ácido crotonico, es posible separar y purificar el contenido de poli-3HB contenido en la biomasa de origen microbiano o vegetal usando termólisis directa a ácido crotonico. En una modificación del procedimiento clásico de crotonaldehído a butanol, el ácido crotonico se reduce a butanol mediante hidrogenación directa. Alternativamente, el ácido crotonico puede esterificarse primero y a continuación hidrogenarse para liberar los alcoholes correspondientes.
- 10 En comparación con el procedimiento de descarboxilación, la etapa de hidrogenación transcurre con la pérdida de agua solamente y el 86% del peso molecular crotonico se conserva en el butanol. El butanol es una materia prima química versátil e importante. Un uso del butanol es para la producción de acrilato de butilo (esterificación de butanol y ácido acrílico) que se utiliza ampliamente en los revestimientos arquitectónicos. La combinación de la conversión de poli-3HP con base en biomasa en ácido acrílico y la conversión de poli-3HB con base en biomasa hasta ácido crotonico seguido por hidrogenación hasta butanol generará 100% de precursores de materia prima renovable que permitirán la producción de acrilato de butilo completamente renovable.

Se han desarrollado muchas técnicas diferentes para hidrogenar ácidos grasos con productos industriales de grasa y aceite de Bailey, proporcionando una buena visión general. Varias patentes describen diversos catalizadores y procedimientos de hidrogenación diferentes (véanse las patentes de Estados Unidos Nos. 5.334.779, 4.480.115 y 6.495.730). La reducción directa de ácido crotonico a butanol también puede realizarse químicamente como se describe en J. Org. Chem. 1981 46 (12).

Históricamente, los ácidos grasos no se han hidrogenado directamente a los correspondientes alcoholes ya que el ácido tiene la tendencia a degradar el catalizador empleado. Por esta razón, el ácido se convierte típicamente en un éster seguido de hidrogenación, típicamente sobre un lecho fijo. Este procedimiento requiere separación y reciclaje del alcohol y, por lo tanto, es menos eficiente que la hidrogenación directa. Se han desarrollado diferentes sistemas de catalizadores para permitir la hidrogenación directa de ácidos grasos en solución acuosa (por ejemplo, hidrogenación de Lurgi de anhídrido maleico a butanodiol). También es posible usar un procedimiento de suspensión para hidrogenar el ácido alimentándolo en una gran corriente de recirculación del producto alcohólico. Bajo las condiciones de reacción esto da como resultado la esterificación *in situ*, protegiendo de ese modo los catalizadores. Ventajosamente, cualquier enlace doble también se reduce simultáneamente.

En ciertas realizaciones, un componente monomérico se modifica o convierte en otros componentes monoméricos. Por ejemplo, el ácido crotonico se modifica adicionalmente o se convierte en otros componentes monoméricos tales como anhídrido maleico. Por ejemplo, el ácido crotonico tiene mercados limitados, pero es un producto químico de construcción muy versátil. La conversión de ácido crotonico a butanol a través de crotonaldehído y también la conversión a propileno a través de la descarboxilación son rutas de modificación, así como la oxidación del ácido crotonico para formar anhídrido maleico. El anhídrido maleico es un bloque de construcción químico funcional con aplicaciones en resinas de poliéster insaturadas, como material de partida para butanodiol y también diversas aplicaciones en plastificantes, agroquímicos y como material de partida para ácidos fumárico y maleico.

El anhídrido maleico se produce típicamente por oxidación parcial catalítica de butano. Varios procedimientos comerciales están en uso, incluida la tecnología de lecho fijo y los procedimientos de tecnología de lecho fluidizado. El anhídrido maleico se recupera y purifica mediante un disolvente o un procedimiento acuoso. Los procedimientos de cristalización en etapa de fusión también se han desarrollado para producir anhídrido maleico de alta pureza después de la separación inicial por destilación. Los procedimientos de cristalización en etapa de fusión también se describen para producir anhídrido maleico de alta pureza después de la separación inicial. La patente de los Estados Unidos N° 5.929.255 describe un procedimiento de precipitación en estado fundido para coproducir y purificar anhídrido maleico y ácido fumárico para evitar pérdidas asociadas con la incineración de ácido fumárico que se coproduce con anhídrido maleico durante la oxidación de butano. La producción directa de ácido maleico a partir de ácido crotonico como se proporciona aquí, ofrece varias ventajas sobre el procedimiento convencional de oxidación de butano. En comparación con el procedimiento de oxidación de butano que tiene un calor de formación $\Delta H_f = -1.236$ kJ/mol, la oxidación parcial directa del ácido crotonico tiene un $\Delta H_f = -504$ kJ/mol. Por lo tanto, el procedimiento genera menos vapor de coproducto que representa una pérdida de rendimiento y también requiere la colocación conjunta de plantas de butano con grandes usuarios de vapor, tales como una refinería.

Huéspedes recombinantes con rutas metabólicas para producir PHA

La ingeniería genética de los huéspedes (por ejemplo, bacterias, hongos, algas, plantas y similares) como plataformas de producción para materiales modificados y nuevos, proporciona una solución sostenible para aplicaciones industriales de alto valor para la producción de productos químicos. En la presente memoria, se describen métodos de procedimiento para producir componentes monoméricos y otros productos químicos modificados a partir de una biomasa recombinante de polihidroxialcanoato (PHA) genéticamente modificada. Los procedimientos descritos en este documento evitan los efectos tóxicos para el organismo huésped mediante la producción del cultivo químico posterior o

recolección posterior química de base biológica, son rentables y altamente eficientes (por ejemplo, usan menos energía para la producción), disminuyen las emisiones de gases de efecto invernadero, usan recursos renovables y pueden ser procesados adicionalmente para producir productos de alta pureza con alto rendimiento.

5 Como se usa en la presente memoria, "biomasa de PHA" pretende significar cualquier biomasa genéticamente modificada que incluye una cantidad no natural de polímero de polihidroxialcanoato (PHA). La biomasa de PHA natural se refiere a la cantidad de PHA que un organismo típicamente produce en la naturaleza. En ciertas realizaciones, el título de biomasa (g/L) de PHA se ha incrementado en comparación con el huésped sin la sobreexpresión o inhibición de uno o más genes en la ruta de PHA. En ciertas realizaciones, el título de PHA se reporta como un porcentaje del peso celular seco (% de pcs) o como gramos de PHA/Kg de biomasa. En algunas realizaciones, una fuente de la biomasa de PHA es un cultivo vegetal, bacterias, levaduras, hongos, algas, cianobacterias o una mezcla de dos o más de los mismos.

10 "Sobreexpresión" se refiere a la expresión de un polipéptido o proteína codificada por un ADN introducido en una célula huésped, en la que el polipéptido o proteína no está normalmente presente en la célula huésped, o cuando el polipéptido o proteína está presente en la célula huésped a un nivel más alto que el normalmente expresado a partir del gen endógeno que codifica el polipéptido o proteína. "Inhibición" o "subregulación" se refiere a la supresión o delección de un gen que codifica un polipéptido o proteína. En algunas realizaciones, la inhibición significa inactivar el gen que produce una enzima en la ruta. En ciertas realizaciones, los genes introducidos son de un organismo heterólogo.

15 Se han desarrollado sistemas de producción de PHA microbianos diseñados genéticamente con organismos de crecimiento rápido tales como *Escherichia coli*. La ingeniería genética permite la modificación de microbios de tipo natural para mejorar la producción de copolímeros de PHA específicos o para introducir la capacidad de producir diferentes polímeros de PHA añadiendo enzimas biosintéticas de PHA que tengan diferentes propiedades de especificidad de sustrato o incluso cinéticas para el sistema natural. Ejemplos de estos tipos de sistemas se describen en Steinbuchel & Valentin, FEMS Microbial Lett. 128: 219 - 28 (1995). La Publicación PCT No. WO 1998/04713 describe métodos para controlar el peso molecular usando ingeniería genética para controlar el nivel de la enzima PHA sintasa. Cepas comercialmente útiles, que incluyen *Alcaligenes eutrophus* (renombrada como *Ralstonia eutropha*), *Alcaligenes latus*, *Azotobacter vinlandii*, y *Pseudomonads*, para la producción de PHA se describen en Lee, Biotechnology & Bioengineering, 49: 1-14 (1996) y Braunegg et al., (1998), J. Biotechnology 65: 127-161. En algunas realizaciones, una fuente de la biomasa incluye la bacteria, *E. coli*. La *E. coli* puede ser una genéticamente modificada para expresar o sobreexpresar uno o más PHA. Ejemplos de cepas, fermentación, medios y condiciones de alimentación se describen en las patentes de Estados Unidos números 6.316.262; 6.323.010; 6.689.589; 7.081.357; 7.202.064 y 7.229.804.

20 El huésped recombinante que contiene los genes necesarios que codificarán la ruta enzimática para la conversión de una sustancia de carbono en PHA se puede construir usando técnicas conocidas en el arte.

25 El siguiente enfoque general se usa para generar productores transgénicos de PHB de *E. coli*: (1) un gen de resistencia a antibióticos sin promotor (abr) se clona en el polienlazador de un plásmido adecuado tal como pUC18NotI o pUC18Sfil de modo que la mayor parte del polienlazador está secuencia arriba de abr; (2) los genes phb se clonan posteriormente secuencia arriba y en la misma orientación que el gen abr; (3) el casete de phb-abr se corta como un fragmento NotI o AvrII (AvrII reconoce el sitio Sfil en pUC18Sfil) y se clona en los sitios correspondientes de cualquier plásmido como los de la serie pUT o pLOF; (4) los plásmidos resultantes se mantienen en cepas de *E. coli* Δ y se electroporan o conjugan en la cepa de *E. coli* de elección en la que estos plásmidos no se replican; y (5) nuevas cepas en las que el casete phb-abr se ha integrado con éxito en el cromosoma se seleccionan en medio selectivo para el huésped (por ejemplo, ácido naladixico cuando el huésped es resistente al ácido naladixico) y para el casete (por ejemplo, cloranfenicol, kanamicina, tetraciclina, cloruro de mercurio, bialafos). Los integrantes de PHB resultantes se criban en un medio mínimo en presencia de glucosa para el crecimiento y la formación de PHB. Se pueden hacer modificaciones de este procedimiento general. Los huéspedes recombinantes que contienen los genes necesarios que codificarán la ruta enzimática para la conversión de un sustrato de carbono en PHA se pueden construir usando técnicas bien conocidas en el arte.

30 Por ejemplo, para la producción de monómero de ácido acrílico, se necesita un huésped genéticamente modificado que produzca P3HP. Para la producción de poli-3HP, se pueden utilizar huéspedes recombinantes tal como aquellos descritos en las patentes de Estados Unidos Nos. 6.576.450, 6.316.262; 6.323.010; 6.689.589; 7.081.357; 7.202.064 y 7.229.804. En general, si un organismo huésped no produce PHA de forma natural, pueden introducirse genes para la vía P3PH. Por ejemplo, para producir los polímeros 3HP directamente a partir de materias primas de carbohidratos, el huésped puede modificarse adicionalmente para expresar glicerol-3-fosfato deshidrogenasa y glicerol-3-fosfatasa. Dichas cepas recombinantes de *E. coli* y los métodos para su construcción se conocen en la técnica (Anton, D. "Biological production of 1,3-propanediol", presentada en la conferencia de United Engineering Foundation Metabolic Engineering II, Elmau, Alemania, octubre 27, 1998, PCT WO 1998/21339).

35 Los huéspedes recombinantes para producir polihidroxialcanoatos (PHA) que comprenden monómeros de 5-hidroxivalerato (5HV) y métodos para producir PHA que comprenden monómeros de 5HV a partir de sustratos de carbono renovables se describen en el documento WO 2010/068953 A2. Un huésped recombinante que expresa genes que codifican una polihidroxialcanoato (PHA) sintasa y una 5-hidroxivalerato-CoA (5HV-CoA) transferasa o 5HV-CoA sintetasa y al menos un transgén que codifica una enzima heteróloga implicada en rutas catabólicas de lisina en las que

- el huésped produce un polímero de PHA que contiene monómeros de 5HV cuando el organismo está provisto de un sustrato de carbono renovable seleccionado de: lisina, almidón, sacarosa, glucosa, lactosa, fructosa, xilosa, maltosa, arabinosa o combinaciones de los mismos y el nivel de monómero de 5HV producido es mayor que en ausencia de expresión del transgén o transgenes que se proporcionan. Un ejemplo de huésped para la producción de poli-5-hidroxiclivalerato expresa uno o más genes que codifican lisina 2-monooxigenasa, 5-aminopentanamida, 5-aminopentanoato transaminasa, glutarato semialdehído reductasa, 5-hidroxiclivalerato CoA-transferasa y polihidroxiclivalerato sintasa para producir un polímero de PHA que contiene monómeros de 5HV. Ciertos huéspedes tienen supresiones o mutaciones en genes que codifican glutarato semialdehído deshidrogenasa y/o genes que codifican el exportador de lisina.
- 5 También se describen huéspedes con uno o más de los genes que codifican la PHA sintasa, la 5HV-CoA transferasa o la SHV-CoA sintetasa también se expresa a partir de un transgén para producir los polímeros de poli-5-hidroxiclivalerato que se pueden usar en los métodos descritos en la presente invención.
- También se pueden usar huéspedes que naturalmente producen PHA y se pueden manipular adicionalmente para aumentar los rendimientos de PHA. Los ejemplos de tales organismos incluyen *Ralstonia eutropha*, *Alcaligenes latus* y *Azotobacter*, pero muchos otros son bien conocidos por los expertos en la técnica (Braunegg et al., 1998, Journal of Biotechnology 65: 127-161). La introducción de la diol deshidratasa se lleva a cabo usando técnicas estándar como lo describen Peoples y Sinskey (1989, J. Biol. Chem. 164, 15298-15303). El huésped genéticamente modificado se puede usar entonces para seleccionar una mayor resistencia al 3-hidroxiacetilaldehído. En otras realizaciones, también pueden utilizarse mutaciones que son beneficiosas para la producción de los homopolímeros de P3HP en estos organismos. Por ejemplo, las mutaciones específicas incluyen la inactivación de los genes de β -cetotilasa y/o acetoacetyl-CoA reductasa. Como estos genes son generalmente bien conocidos y están disponibles o pueden aislarse, las alteraciones génicas se pueden llevar a cabo fácilmente como se describe, por ejemplo, por Slater et. al., 1998 (J. Bacteriol.) 180 (8): 1979-87.
- 15 El ácido acrílico, también conocido como ácido 2-propenoico, significa el ácido carboxílico que tiene la fórmula química $C_3H_4O_2$. El ácido acrílico es un líquido transparente e incoloro que es soluble en agua y es totalmente miscible en alcoholes, éteres y cloroformo. El ácido acrílico es el ácido carboxílico insaturado más simple con un doble enlace y un grupo carbonilo. El ácido acrílico incluye el ion acrilato y sus sales. Como se usa en el presente documento, "éster de acrilato" se refiere a la forma éster del ácido acrílico.
- 20 Los métodos para obtener los genes deseados de un organismo fuente (huésped) son comunes y bien conocidos en la técnica de la biología molecular. Dichos métodos se pueden encontrar descritos, por ejemplo, en Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, tercera Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York (2001); Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, MD (1999). Por ejemplo, si se conoce la secuencia del gen, el ADN puede amplificarse a partir de ADN genómico usando la reacción en cadena de la polimerasa (Mullis, patente de Estados Unidos No. 4.683.202) con cebadores específicos para el gen de interés para obtener cantidades de ADN adecuadas para la ligación en vectores apropiados. Alternativamente, el gen de interés puede sintetizarse químicamente nuevamente con el fin de tomar en consideración el sesgo del codón del organismo huésped para potenciar la expresión de proteínas heterólogas. Las secuencias de control de la expresión tales como los promotores y los terminadores de la transcripción se pueden unir a un gen de interés a través de la reacción en cadena de la polimerasa usando cebadores modificados genéticamente que contienen tales secuencias. Otra forma es introducir el gen aislado en un vector que ya contiene las secuencias de control necesarias en el orden apropiado mediante digestión con endonucleasas de restricción y ligación. Un ejemplo de este último enfoque es la tecnología BioBrick^{MR} (véase la página web en biobricks.org) donde múltiples piezas de ADN se pueden ensamblar secuencialmente de forma estandarizada utilizando los mismos dos sitios de restricción.
- 30 Además de usar vectores, los genes que son necesarios para la conversión enzimática de un sustrato de carbono a PHA se pueden introducir en un organismo huésped mediante integración en el cromosoma usando un enfoque dirigido o aleatorio. Para una integración dirigida en un sitio específico en el cromosoma, se usa el método generalmente conocido como modificación recombinante Red/ET como se describió originalmente por Datsenko y Wanner (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000, 97, 6640-6645). La integración aleatoria en el cromosoma implica el uso de un enfoque mediado por el transposón mini-Tn5 como lo describen Huisman et al. (patentes de Estados Unidos Nos. 6.316.262 y 6.593.116).
- 35 Se han desarrollado cepas para producir copolímeros, algunos de los cuales se han producido en *E. coli* recombinante. Estos copolímeros incluyen poli(3-hidroxiacetil-CoA-co-3-hidroxiclivalerato) (PHBV), poli(3-hidroxiacetil-CoA-co-4-hidroxiacetil-CoA) (P3HB-co-4HB), poli(4-hidroxiacetil-CoA) (P4HB) y los PHA de cadena lateral larga que comprenden unidades de 3-hidroxiacetil-CoA (Madison y Huisman, 1999). Se han desarrollado cepas de *E. coli* que contienen los genes *phb* en un plásmido para producir P(3HB-3HV) (Slater, et al., Appl. Environ. Microbiol. 58: 1089-94 (1992); Fidler & Dennis, FEMS Microbiol. Rev. 103: 231-36 (1992); Rhie y Dennis, Appl. Environ. Microbiol. 61: 2487-92 (1995); Zhang, H. et al., Appl. Environ. Microbiol. 60: 1198-205 (1994)). La producción de P(4HB) y P(3HB-4HB) en *E. coli* se consigue introduciendo genes de una vía metabólicamente no relacionada en un productor de P(3HB) (Hein, et al., FEMS Microbiol. Lett. 153: 411-18 (1997); Valentin y Dennis, J. Biotechnol., 58: 33-38 (1997)). *E. coli* también ha sido modificado para producir polihidroxiclivalerato medianos de cadena corta (*msc*-PHA) mediante la introducción del gen *phaC1* y *phaC2* de *P. aeruginosa* en un mutante *fadB::kan* (Langenbach, et al., FEMS Microbiol. Lett. 150: 303-09 (1997); Qi, et al., FEMS Microbiol. Lett. 157: 155-62 (1997)).
- 50
- 55
- 60

Se han descrito métodos para la producción de plantas en la patente de los Estados Unidos No. 5.245.023 y en las patentes de los Estados Unidos Nos. 5.250.430; 5.502.273; 5.534.432; 5.602.321; 5.610.041; 5.650.555; 5.663.063; y las publicaciones PCT Nos.: WO 1991/00917, WO 1992/19747, WO 1993/02187, WO 1993/02194 y WO 1994/12014, Poirier et al., 1992, Science 256; 520-523, Williams y Peoples, 1996. Chemtech 26, 38-44, cuyas enseñanzas se incorporan aquí por referencia).

Se han desarrollado plantas transgénicas, en particular plantas transplastómicas, que producen mayores niveles de polihidroxialcanoatos (PHA). Se describen métodos y constructos para la modificación genética de plastos de plantas con genes para PHA estable, de alto nivel, en particular la producción de PHB. Véase, por ejemplo, la publicación PCT No.: WO 2010/102220. Se han reportado pruebas de estudio de concepto para la síntesis de polihidroxibutirato (PHB) en pasto varilla (Somleva et al., Plant Biotechnol. J. 6: 663-678 (2008)), caña de azúcar (Petrasovits et al., Plant Biotechnol. J. 5: 162-172 (2007)), Purnell et al., Plant Biotechnol. J. 5: 173-184 (2007)), canola (Valentin et al., Int. J. Biol. Macromol., 25: 303-306 (1999)); Slater et al. al., Nat. Biotechnol. 17: 1011-1016 (1999); Houmiel et al., Planta 209: 547-550 (1999)), y rastrojo de maíz (Poirier et al., 2002, Polyhydroxyalkanoate production in transgenic plants, en Biopolymers, Vol 3a, Steinbuchel, A. (ed), Wiley-VHC Verlag GmbH, páginas 401-435). Si bien estos estudios han producido resultados científicos significativos (Slater et al., Nat. Biotechnol., 17: 1011-1016 (1999)), se necesitan mayores rendimientos que mejoran la economía general del polímero producido en una plataforma de cultivo. El porcentaje en peso de PHA en la biomasa silvestre varía con respecto a la fuente de la biomasa. Para sistemas microbianos producidos por un procedimiento de fermentación a partir de materias primas basadas en recursos renovables tales como azúcares, aceites vegetales o glicerol, la cantidad de PHA en la biomasa puede ser aproximadamente de 65% en peso, o más, del peso total de la biomasa. Para los sistemas de cultivo de plantas, en particular los cultivos de biomasa, tales como la caña de azúcar o el pasto varilla, la cantidad de PHA puede ser de aproximadamente 3%, o más, del peso total de la biomasa. Para las algas o los sistemas de cianobacterias, la cantidad de PHA puede ser de aproximadamente 40% o más del peso total de la biomasa.

Solicitud de patente de Estados Unidos: US20100229258, describe plantas transgénicas fértiles que producen niveles elevados de PHA, es decir, al menos 10% en peso seco en tejidos de plantas y se produjeron usando expresión génica codificada por plástidos.

En ciertos aspectos de la presente descripción, el huésped recombinante ha sido modificado genéticamente para producir una cantidad mayor de PHA en comparación con el huésped de tipo silvestre. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, el PHA se incrementa entre aproximadamente el 20% y aproximadamente el 90% sobre el tipo silvestre o entre aproximadamente el 50% y aproximadamente el 80%. En otras realizaciones, el huésped recombinante produce al menos aproximadamente un 20% de aumento de PHA sobre el tipo silvestre, al menos aproximadamente un 30% de aumento sobre el tipo silvestre, al menos aproximadamente un 40% de aumento sobre el tipo silvestre, al menos aproximadamente un 50% de aumento sobre el tipo silvestre, al menos aproximadamente 60% de incremento sobre el tipo silvestre, al menos aproximadamente 70% de aumento sobre el tipo silvestre, al menos aproximadamente 75% de aumento sobre el tipo silvestre, al menos aproximadamente 80% de aumento sobre el tipo silvestre o al menos aproximadamente 90% de aumento sobre el tipo silvestre. En otras realizaciones, el PHA está entre aproximadamente un aumento de 2 veces hasta aproximadamente un aumento de 400 veces sobre la cantidad producida por el huésped de tipo silvestre. La cantidad de PHA en el huésped o planta se determina por cromatografía de gases de acuerdo con los procedimientos descritos en Doi, Microbial Polyesters, John Wiley & Sons, página 24, 1990. En ciertas realizaciones, se logra un título de biomasa de 100-120 g de PHA/Kg de biomasa. En otras realizaciones, la cantidad de título de PHA se presenta como porcentaje de peso de células secas (% de dcw).

En algunas realizaciones, el PHA es poliglicólido, poli-3-hidroxipropionato, poli-3-hidroxibutirato, poli-4-hidroxibutirato, poli-5-hidroxibutirato o un copolímero de los mismos. En ciertas realizaciones, el PHA es poliglicólido, poli-3-hidroxipropionato, poli-3-hidroxibutirato, poli-4-hidroxibutirato o poli-5-hidroxibutirato. En ciertas realizaciones, el PHA es poli-3-hidroxibutirato. En otras realizaciones, el PHA es poli-3-hidroxipropionato.

En ciertas realizaciones, puede ser deseable marcar los constituyentes de la biomasa. Por ejemplo, puede ser útil marcar deliberadamente con un isótopo de carbono (por ejemplo, ^{13}C) para facilitar la determinación de la estructura o por otros medios. Esto se logra cultivando microorganismos modificados genéticamente para expresar los constituyentes, por ejemplo, polímeros, pero en lugar de los medios usuales, las bacterias se cultivan en un medio de crecimiento con fuente de carbono que contiene ^{13}C , como glucosa, glicerol, ácido pirúvico, etc. De esta manera, se pueden producir polímeros que están marcados con ^{13}C de manera uniforme, parcial o en sitios específicos. Además, el etiquetado permite conocer el porcentaje exacto en bioplásticos que provienen de fuentes renovables (por ejemplo, derivados de plantas) a través de la norma ASTM D6866, una aplicación industrial de datación por radiocarbono. La norma ASTM D6866 mide el contenido de carbono 14 de materiales biológicos; y dado que los materiales basados en fósiles ya no tienen carbono 14, la norma ASTM D6866 puede disipar efectivamente las afirmaciones inexactas de contenido de base biológica.

Cultivo del huésped para producir biomasa de PHA

En general, el huésped recombinante se cultiva en un medio con una fuente de carbono y otros nutrientes esenciales para producir la biomasa de PHA mediante técnicas de fermentación en lotes o en forma continua usando métodos conocidos en la técnica. También se pueden incluir aditivos adicionales, por ejemplo, agentes antiespumantes y

similares para lograr las condiciones de crecimiento deseadas. La fermentación es particularmente útil para la producción a gran escala. Un ejemplo de un método utiliza biorreactores para cultivar y procesar el caldo de fermentación para el producto deseado. Otras técnicas, como las técnicas de separación, se pueden combinar con la fermentación para producción a gran escala y/o continua.

5 Como se usa en el presente documento, el término "materia prima" se refiere a una sustancia utilizada como materia prima de carbono en un procedimiento industrial. Cuando se usa en referencia a un cultivo de organismos tales como organismos microbianos o de algas, como un procedimiento de fermentación con células, el término se refiere a la materia prima utilizada para suministrar un carbono u otra fuente de energía para las células. Las fuentes de carbono útiles para la producción de componentes monoméricos incluyen fuentes simples y económicas, por ejemplo, glucosa, 10 sacarosa, lactosa, fructosa, xilosa, maltosa, arabinosa y similares. En otras realizaciones, la materia prima es melaza o almidón, ácidos grasos, aceites vegetales o un material lignocelulósico y similares. También es posible usar organismos para producir la biomasa de PHA que crece en el gas de síntesis (CO₂, CO e hidrógeno) producido a partir de recursos de biomasa renovables.

15 La introducción de los genes de la ruta de PHA permite flexibilidad en la utilización de materias primas fácilmente disponibles y de bajo costo. Como se usa en el presente documento, el término "materia prima" se refiere a una sustancia utilizada como materia prima en un procedimiento industrial. Cuando se usa en referencia a un cultivo de organismos microbianos o de algas, como un procedimiento de fermentación con células, el término se refiere a la materia prima utilizada para suministrar carbono u otra fuente de energía para las células. Una materia prima "renovable" se refiere a una fuente de energía renovable, como el material derivado de organismos vivos o sus 20 subproductos metabólicos, incluido el material derivado de la biomasa, que a menudo consiste en componentes subutilizados como la paja o el rastrojo. Los productos agrícolas específicamente cultivados para su uso como materias primas renovables incluyen, por ejemplo, maíz, soja, pasto varilla y árboles como el álamo, el trigo, la linaza y la colza, la caña de azúcar y el aceite de palma. Como fuentes renovables de energía y materias primas, las materias primas agrícolas basadas en cultivos son el reemplazo final de las reservas de petróleo en declive. Las plantas usan energía 25 solar y dióxido de carbono para elaborar miles de compuestos bioquímicos complejos y funcionales más allá de la capacidad de la química sintética moderna. Estos incluyen productos químicos finos y a granel, productos farmacéuticos, polímeros, resinas, aditivos alimentarios, biocolorantes, adhesivos, solventes y lubricantes.

30 En general, durante o después de la producción (por ejemplo, mediante cultivo) de la biomasa de PHA, la biomasa se combina con un catalizador para convertir el polímero de PHA en un producto del componente monomérico de alta pureza. El catalizador (en forma sólida o en solución) y la biomasa se combinan, por ejemplo, mediante mezcla, floculación, centrifugación o secado por atomización u otro método adecuado conocido en la técnica para promover la interacción de la biomasa y el catalizador que conduce una conversión eficiente y específica de PHB en el componente monomérico. En algunas realizaciones, la biomasa se seca inicialmente, por ejemplo, a una temperatura entre 35 aproximadamente 100°C y aproximadamente 150°C y durante una cantidad de tiempo para reducir el contenido de agua de la biomasa. La biomasa seca se vuelve a suspender en agua antes de combinarse con el catalizador. Las temperaturas y duración adecuadas para el secado se determinan para la pureza y el rendimiento del producto y en algunas realizaciones pueden incluir bajas temperaturas para eliminar agua (tal como entre 25°C y 150°C) durante un período de tiempo prolongado o en otras realizaciones pueden incluir secado en una temperatura alta (por ejemplo, superior a 450°C) durante un período corto de tiempo. Alternativamente, el agua se puede eliminar mediante otros 40 métodos conocidos en la técnica distintos del calentamiento. Bajo "condiciones adecuadas" se refiere a las condiciones que promueven la reacción catalítica. Por ejemplo, bajo condiciones que maximizan la generación del componente monomérico del producto tal como en presencia de coagentes u otro material que contribuye a la eficacia de la reacción. Otras condiciones adecuadas incluyen la ausencia de impurezas, tales como metales u otros materiales que dificultarían el progreso de la reacción.

45 Degradación térmica de la biomasa de PHA

"Calentamiento", "pirólisis", "termólisis" y "torrefacción" como se usan en la presente memoria se refieren a la degradación térmica (por ejemplo, descomposición) de la biomasa de PHA para la conversión en componentes monoméricos. En general, la degradación térmica de la biomasa de PHA se produce a una temperatura elevada en presencia de un catalizador. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la temperatura de calentamiento para los 50 procedimientos descritos aquí está entre aproximadamente 200°C hasta aproximadamente 400°C. En algunas realizaciones, la temperatura de calentamiento es de aproximadamente 200°C hasta aproximadamente 350°C. En otras realizaciones, la temperatura de calentamiento es aproximadamente 300°C. "Pirólisis" típicamente se refiere a una descomposición termoquímica de la biomasa a temperaturas elevadas durante un período de tiempo. La duración puede oscilar desde unos pocos segundos hasta horas. En ciertas condiciones, ocurre la pirólisis en ausencia de oxígeno o en presencia de una cantidad limitada de oxígeno para evitar la oxigenación. Los procedimientos para la pirólisis de biomasa de PHA pueden incluir transferencia directa de calor o transferencia de calor indirecta. La "pirólisis ultrarrápida" se refiere a calentar rápidamente la biomasa a alta temperatura para la descomposición rápida de la biomasa de PHA, por ejemplo, la despolimerización de un PHA en la biomasa. Otro ejemplo de pirólisis ultrarrápida es la pirólisis térmica rápida RTP^{MR}. La tecnología y el equipo de RTP^{MR} de Envergent Technologies, Des Plaines, IL, convierte las materias 55 primas en bioaceite. "Torrefacción" se refiere al procedimiento de torrefacción, que es un término reconocido en la técnica que se refiere al secado de la biomasa. El procedimiento típicamente implica calentar una biomasa en un intervalo de temperatura de aproximadamente 200 hasta aproximadamente 350°C, durante un período relativamente

largo (por ejemplo, 10-30 minutos), típicamente en ausencia de oxígeno. El procedimiento resulta, por ejemplo, en una biomasa torrefactada que tiene un contenido de agua que es inferior al 7% en peso de la biomasa. La biomasa torrefactada puede procesarse posteriormente. En algunas realizaciones, el calentamiento se realiza al vacío, a presión atmosférica o bajo presión controlada. En ciertas realizaciones, el calentamiento se logra sin el uso o con un uso reducido de energía generada por petróleo.

En ciertas realizaciones, la biomasa de PHA se seca antes del calentamiento. Alternativamente, en otras realizaciones, el secado se realiza durante la degradación térmica (por ejemplo, calentamiento, pirólisis o torrefacción) de la biomasa de PHA. El secado reduce el contenido de agua de la biomasa. En ciertas realizaciones, la biomasa se seca a una temperatura de entre aproximadamente 100°C hasta aproximadamente 350°C, por ejemplo, entre aproximadamente 200°C y aproximadamente 275°C. En algunas realizaciones, la biomasa de PHA seca tiene un contenido de agua de 5% en peso, o menos.

El calentamiento de la mezcla de biomasa/catalizador de PHA se lleva a cabo durante un tiempo suficiente para convertir eficiente y específicamente la biomasa de PHA en un componente monomérico. En ciertas realizaciones, el período de tiempo para el calentamiento es de aproximadamente 30 segundos a aproximadamente 1 minuto, de aproximadamente 30 segundos hasta aproximadamente 1,5 minutos, de aproximadamente 1 minuto hasta aproximadamente 10 minutos, de aproximadamente 1 minuto hasta aproximadamente 5 minutos o un tiempo entre, por ejemplo, aproximadamente 1 minuto, aproximadamente 2 minutos, aproximadamente 1,5 minutos, aproximadamente 2,5 minutos, aproximadamente 3,5 minutos.

En otras realizaciones, el período de tiempo es de aproximadamente 1 minuto hasta aproximadamente 2 minutos. En otras realizaciones más, la duración del tiempo de calentamiento es durante un tiempo entre aproximadamente 5 minutos y aproximadamente 30 minutos, entre aproximadamente 30 minutos y aproximadamente 2 horas, o entre aproximadamente 2 horas y aproximadamente 10 horas o durante más de 10 horas (por ejemplo, 24 horas).

En ciertas realizaciones, la temperatura de calentamiento es a una temperatura de aproximadamente 200°C hasta aproximadamente 350°C que incluye una temperatura entre, por ejemplo, aproximadamente 205°C, aproximadamente 210°C, aproximadamente 215°C, aproximadamente 220°C, aproximadamente 225°C, aproximadamente 230°C, aproximadamente 235°C, aproximadamente 240°C, aproximadamente 245°C, aproximadamente 250°C, aproximadamente 255°C, aproximadamente 260°C, aproximadamente 270°C, aproximadamente 275°C, aproximadamente 280°C, aproximadamente 290°C, aproximadamente 300°C, aproximadamente 310°C, aproximadamente 320°C, aproximadamente 330°C, aproximadamente 340°C, o 345°C. En ciertas realizaciones, la temperatura es aproximadamente 250°C. En ciertas realizaciones, la temperatura es aproximadamente 275°C.

Como se usa en el presente documento, "metátesis de olefina" se refiere a una reacción orgánica que implica la redistribución de fragmentos de alqueno mediante la escisión de dobles enlaces carbono-carbono en olefinas (alquenos). Las ventajas de la metátesis de las olefinas incluyen la creación de menos productos secundarios y desechos peligrosos. La reacción se lleva a cabo a través de la escisión de doble enlace de alqueno, seguido de una redistribución estadística de fragmentos de alquilideno. La reacción es catalizada por catalizadores organometálicos que incluyen metales tales como níquel, tungsteno, renio, rutenio y molibdeno. En comparación, los catalizadores de molibdeno son típicamente más reactivos frente a las olefinas, aunque también reaccionan con aldehídos y otros grupos polares o próticos. El rutenio reacciona preferentemente con dobles enlaces carbono-carbono sobre la mayoría de las otras especies, lo que hace que estos catalizadores sean inusualmente estables frente a alcoholes, amidas, aldehídos y ácidos carboxílicos. Los ejemplos de catalizadores incluyen los catalizadores de Grubbs (complejos de rutenio-carbina) y catalizadores de alquilidenos de Schrock (catalizadores basados en molibdeno (VI) y volframio (VI)) discutidos con más detalle a continuación. En los métodos descritos en este documento, la metátesis de olefina es metátesis cruzada.

Como se usa en el presente documento, "catalizador" se refiere a una sustancia que inicia o acelera una reacción química sin verse afectada o consumida en la reacción. Los ejemplos de catalizadores útiles incluyen catalizadores metálicos. En ciertas realizaciones, el catalizador reduce la temperatura para el inicio de la descomposición térmica y aumenta la velocidad de descomposición térmica a ciertas temperaturas de pirólisis (por ejemplo, aproximadamente 200°C hasta aproximadamente 325°C).

De acuerdo con algunas realizaciones de cualquiera de los procedimientos, la eficiencia de la conversión y la selectividad para un producto químico intermedio particular se promueve mediante la adición de un catalizador a la biomasa antes o durante la conversión. El catalizador es un material que promoverá reacciones de eliminación o reacciones de descompresión del hidroxilo ω de las cadenas poliméricas de PHA en la biomasa. En ciertas realizaciones, el catalizador es un catalizador metálico. En algunas realizaciones, el catalizador es un compuesto de cloruro, óxido, hidróxido, nitrato, fosfato, sulfonato, carbonato o estearato que contiene un ion metálico que es aluminio, antimonio, bario, bismuto, cadmio, calcio, cerio, cromo, cobalto, cobre, galio, hierro, lantano, plomo, litio, magnesio, molibdeno, níquel, paladio, potasio, plata, sodio, estroncio, estaño, tungsteno, vanadio o zinc. En algunas realizaciones, el catalizador es un catalizador orgánico que incluye, pero no se limita a, una amina, azida, enol, glicol, sal de amonio cuaternario, fenóxido, cianato, tiocianato, dialquilamida y alquil tiolato. La cantidad de catalizador es una cantidad suficiente para promover la reacción. También se incluyen mezclas de dos o más catalizadores.

- En ciertas realizaciones, la cantidad de catalizador metálico es de aproximadamente 0,1% hasta aproximadamente 15% con base en el peso del ion metálico respecto al peso de sólido seco de la biomasa. En algunas realizaciones, la cantidad de catalizador está entre aproximadamente 7,5% y aproximadamente 12%. En otras realizaciones, la cantidad de catalizador es aproximadamente 0,5% de peso de células secas, aproximadamente 1%, aproximadamente 2%, aproximadamente 3%, aproximadamente 4%, aproximadamente 5%, aproximadamente 6%, aproximadamente 7%, aproximadamente 8%, aproximadamente 9 %, aproximadamente 10%, aproximadamente 11%, aproximadamente 12%, aproximadamente 13%, aproximadamente 14%, aproximadamente 15%, o más, tal como hasta 20%, o más, tal como hasta 30%, o más, tal como hasta 40% o más, tal como hasta 50%.
- En ciertas realizaciones, la recuperación del catalizador se incluye adicionalmente en los procedimientos de la invención. Por ejemplo, cuando se usa un catalizador de calcio, la calcinación es una técnica de recuperación útil. La calcinación es un procedimiento de tratamiento térmico que se lleva a cabo en minerales, metales o menas para cambiar los materiales a través de descarboxilación, deshidratación, desvolatilización de la materia orgánica, transformación de fase u oxidación. El procedimiento se lleva a cabo normalmente en reactores tales como hornos de solera, hornos de cuba, hornos rotatorios o, más recientemente, reactores de lecho fluidizado. La temperatura de calcinación se elige para que esté por debajo del punto de fusión del sustrato, pero por encima de su temperatura de descomposición o transición de fase. A menudo esta se toma como la temperatura a la cual la energía de reacción libre de Gibbs es igual a cero. Para la descomposición de CaCO_3 a CaO , la temperatura de calcinación en $\Delta G = 0$ se calcula que es $\sim 850^\circ\text{C}$. Típicamente para la mayoría de los minerales, la temperatura de calcinación está en el intervalo de $800\text{-}1.000^\circ\text{C}$.
- Para recuperar el catalizador de calcio de la biomasa después de la recuperación del componente monomérico, se transferiría el residuo de biomasa agotado directamente de la pirólisis o torrefacción a un reactor de calcinación y se continuaría calentando el residuo de biomasa al aire a $825\text{-}850^\circ\text{C}$ durante un período de tiempo para eliminar todos los rastros de la biomasa orgánica. Una vez que se elimina la biomasa orgánica, el catalizador podría usarse como tal o purificarse más mediante separación de los óxidos metálicos presentes (del medio de fermentación y el catalizador) con base en la densidad utilizando un equipo conocido por los expertos en la técnica.
- Como se usa en el presente documento, el término "cantidad suficiente" cuando se usa en referencia a un reactivo químico en una reacción pretende significar una cantidad del reactivo de referencia que puede satisfacer las demandas de la reacción química.
- Como se usa en el presente documento, "hidrogenación" significa tratar con hidrógeno, también una forma de reducción química, es una reacción química entre hidrógeno molecular (H_2) y otro compuesto o elemento, habitualmente en presencia de un catalizador. El procedimiento se emplea comúnmente para reducir o saturar compuestos orgánicos.
- Como se usa en este documento, "alquilo inferior" se refiere a un alquilo C2-C4, (por ejemplo, etilo, propilo, butilo).
- Como se usa en el presente documento, alqueno inferior se refiere a un alqueno C2-C4, (por ejemplo, eteno (etileno), propileno, buteno). "Etileno" (eteno) es un gas inflamable incoloro que presenta solubilidad en agua. "Propileno" es un compuesto orgánico insaturado que tiene la fórmula química C_3H_6 . "Buteno", también conocido como butileno, es un alqueno con la fórmula C_4H_8 . Es un gas incoloro que está presente en el petróleo crudo como un constituyente menor en cantidades que son demasiado pequeñas para una extracción viable. Por lo tanto, se obtiene por craqueo catalítico de hidrocarburos de cadena larga que quedan durante el refinado del petróleo crudo. El craqueo produce una mezcla de productos y el 2-buteno se extrae por destilación fraccionada.
- "Esterificación", como se usa en el presente documento, se refiere a la reacción química en la que dos reactivos (típicamente un alcohol y un ácido) forman un éster como el producto de reacción.
- Una "huella de carbono" es una medida del impacto que tienen los procedimientos en el medio ambiente, y en particular en el cambio climático. Se relaciona con la cantidad de gases de efecto invernadero producidos.
- La presente tecnología, así descrita en general, se entenderá más fácilmente por referencia a los siguientes ejemplos, que se proporcionan a modo de ilustración y no pretenden ser limitantes de la presente tecnología.
- En ciertas realizaciones, "recuperar" el vapor de monómero incluye condensar el vapor. Como se usa en el presente documento, el término "recuperar" cuando se aplica al vapor significa aislarlo de los materiales de la biomasa de PHA, por ejemplo, incluyendo, pero sin limitarse a: recuperación por condensación, metodologías de separación, tales como el uso de membranas, separación en fase gaseosa (por ejemplo, vapor), tal como destilación, y similares. Por lo tanto, la recuperación puede lograrse a través de un mecanismo de condensación que captura el vapor del componente monomérico, condensa el vapor del componente monomérico a una forma líquida y lo transfiere lejos de los materiales de la biomasa.
- Como un ejemplo no limitativo, la condensación de vapor del componente monomérico se puede describir de la siguiente manera. La corriente de gas/vapor entrante de la cámara de pirólisis/torrefacción entra en un intercambiador, donde la corriente de gas/vapor puede enfriarse previamente. La corriente de gas/vapor pasa luego a través de un enfriador donde la temperatura de la corriente de gas/vapor se reduce a la requerida para condensar los vapores designados del gas por contacto indirecto con un refrigerante. El gas y los vapores condensados fluyen desde el

enfriador a un separador, donde los vapores condensados se recogen en el fondo. El gas, libre de vapores, fluye desde el separador, pasa a través del intercambiador y sale de la unidad. Los líquidos recuperados fluyen, o se bombean, desde el fondo del separador hasta el almacenamiento. Para algunos de los productos, los vapores condensados se solidifican y el sólido se recoge.

5 En otras realizaciones, el componente monomérico puede purificarse adicionalmente si es necesario mediante procedimientos adicionales conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante destilación, mediante destilación reactiva (por ejemplo, el componente monomérico se acidifica primero para oxidar ciertos componentes (por ejemplo, para facilidad de separación) y luego se destila) mediante tratamiento con carbón activado para la eliminación de cuerpos de color y/o olor, mediante tratamiento de intercambio iónico, mediante extracción líquido-líquido con un componente
10 monomérico disolvente inmiscible para eliminar ácidos grasos, etc., para purificación después de la recuperación del monómero, mediante destilación al vacío, mediante destilación por extracción o usando métodos similares que darían como resultado una purificación adicional del componente monomérico para aumentar el rendimiento del monómero. Las combinaciones de estos tratamientos también se pueden utilizar.

15 En ciertas realizaciones, el procedimiento es selectivo para producir monómeros con una cantidad relativamente pequeña de productos secundarios no deseados. El término "componente monomérico" del procedimiento incluye el monómero y productos secundarios, tales como dímeros y oligómeros. En ciertas realizaciones, el componente monomérico puede incluir 95% en peso de monómero tal como ácido acrílico y 5% de productos secundarios tales como dímeros. De este modo, la cantidad de monómero en el componente monomérico puede ser de aproximadamente 70%
20 en peso, aproximadamente 71% en peso, aproximadamente 72% en peso, aproximadamente 73% en peso, aproximadamente 74% en peso, aproximadamente 75% en peso, aproximadamente 76 % en peso, aproximadamente 77% en peso, aproximadamente 78% en peso, aproximadamente 79% en peso, aproximadamente 80% en peso, 81% en peso, aproximadamente 82% en peso, aproximadamente 83% en peso, aproximadamente 84% en peso, aproximadamente 85% en peso, aproximadamente 86% en peso, aproximadamente 87% en peso, aproximadamente 88% en peso, aproximadamente 89% en peso, aproximadamente 90% en peso, 91% en peso, aproximadamente 92%
25 en peso, aproximadamente 93% en peso, aproximadamente 94% en peso, aproximadamente 95% en peso, aproximadamente 96% en peso, aproximadamente 97% en peso, aproximadamente 98% en peso, aproximadamente 99% en peso o aproximadamente 100% en peso.

30 El uso de un catalizador específico en una cantidad suficiente reducirá la producción de productos secundarios indeseados y aumentará el rendimiento del monómero en al menos aproximadamente 2 veces. En algunas realizaciones, la producción de productos secundarios no deseados se reducirá hasta al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 20% al menos aproximadamente 10%, o aproximadamente al menos aproximadamente 5%. En cierta realización, los productos secundarios no deseados serán menos de aproximadamente 5% del monómero recuperado, menos de aproximadamente 4% del monómero recuperado, menos de aproximadamente 3% del monómero recuperado, menos
35 de aproximadamente 2% del monómero recuperado, o menos de aproximadamente 1% del monómero recuperado.

Los procedimientos descritos en este documento pueden proporcionar un rendimiento del componente monomérico expresado como porcentaje de rendimiento, por ejemplo, cuando se cultiva a partir de glucosa como fuente de carbono, el rendimiento es de hasta 95% con base en [gramo del componente de PHA por gramo de glucosa] x 100% o el rendimiento de monómero se expresa como [gramo del monómero por gramo de componente de PHA] x 100%. En otras
40 realizaciones, el rendimiento está en un intervalo entre aproximadamente 40% y aproximadamente 95%, por ejemplo, entre aproximadamente 50% y aproximadamente 70%, o entre aproximadamente 60% y 70%. En otra realización, el rendimiento es aproximadamente 75%, aproximadamente 70%, aproximadamente 65%, aproximadamente 60%, aproximadamente 55%, aproximadamente 50%, aproximadamente 45% o aproximadamente 40%. Por lo tanto, se puede calcular el rendimiento ((g del componente monomérico/g de PHA inicial) x100%)

45 Producción de ácido crotónico

El ácido crotónico es un intermedio químico útil que se produce comercialmente mediante la oxidación catalítica de crotonaldehído. El tamaño del mercado de ácido crotónico se estima actualmente en \$ 5 millones. Sin embargo, no se utiliza como materia prima del producto químico intermedio porque puede convertirse catalíticamente en productos químicos de mayor valor añadido como butanol, ácido acrílico, ácido maleico y ácido fumárico que son componentes
50 básicos para la producción de adhesivos, pinturas, recubrimientos y productos de cuidado personal y resinas modificadas.

Se han informado recientemente nuevos procedimientos para convertir productos olefínicos "naturales" en productos químicos de base biológica útiles (J. Metzger (2009), Eur. J. Lipid Sci, 111, página 865; A. Ryback, M. Meier (2007), Greet Chem., 9, página 1356; el documento US2009/0155866A1, de M. Burk et al.). La clave de estos procedimientos es el uso de catalizadores de metátesis para hacer reaccionar diferentes tipos de olefinas, de los cuales los primeros catalizadores bien definidos y altamente activos fueron desarrollados por Schrock y Grubb y posteriormente extendidos por Hoveyda (Y. Schrodt, R. Pederson (2007), Aldrichimica ACTA, volumen 40, No. 2, página 45).
55

La metátesis cruzada se ha convertido en una ruta de reacción particularmente importante para producir productos químicos de base biológica a partir de materias primas de biomasa. Por ejemplo, la metátesis cruzada de ácidos grasos

insaturados basados en plantas con etileno tiene el potencial de producir de manera sostenible una variedad de polímeros que incluyen poliésteres, poliamidas y poliéteres con alto rendimiento (V.P. Kukhar (2009), *Kem. Ind.*, 58 (2), página 57). El etileno es un monómero conveniente para reaccionar con otros compuestos de base biológica, ya que puede conducir directamente a una gama de productos intermedios básicos de gran volumen como ácidos y ésteres acrílicos. Con el desarrollo de etileno "verde", producido por deshidratación catalítica de etanol de base biológica (A. Morschbaker (2009), *Polymer Reviews*, volumen 49, No. 2, pág. 79), la capacidad para producir compuestos intermedios 100% de base biológica se está convirtiendo en una opción atractiva. Sin embargo, un desafío para hacer reaccionar el monómero de etileno con catalizadores de Grubbs es la propensión del etileno a desactivar o degradar el catalizador, lo que conduce a bajas tasas de conversión y pérdida de rendimiento (Z. Lysenko et al. (2006), *J. of Organometallic Chem.*, 691, página 5197; X. Lin et al. (2010), *J. of Molecular Catalysis A: Chemical*, 330, página 99; K. Burdett et al. (2004), *Organometallics*, 23, página 2027). Esto es especialmente importante cuando se desarrollan aplicaciones industriales que usan catalizadores de metátesis.

En la presente memoria se describen métodos que superan este problema utilizando un método y procedimiento de reacción de catálisis múltiple en tándem. En la primera etapa, el etileno y el 2-buteno se convierten primero en propileno usando un catalizador de metátesis que no es sensible a la desactivación por etileno tal como los catalizadores de molibdeno-alquilideno o de tungsteno-alquilideno de Schrock (Schrock et al. (1988), *J. Am. Chem. Soc.*, 110, página 1423). En la segunda etapa, el propileno se hace reaccionar luego con el compuesto de base biológica deseado usando un catalizador de Grubb (tal como (1,3-bis(2,4,6-trimetilfenil)-2-imidazolidinilideno)dicloro(o-isopropoxifenilmetilén) rutenio). En este esquema de reacción, el catalizador de Grubb nunca se expone al etileno y, por lo tanto, es capaz de mantener las altas velocidades de reacción y los altos rendimientos necesarios para los procedimientos bioquímicos industriales.

En un aspecto de la invención, se describe un procedimiento continuo de biorrefinería para la producción de ácido acrílico a partir de biomasa de PHA usando un protocolo de reacción de catálisis múltiple en tándem. El procedimiento incluye cultivar una biomasa de PHA genéticamente modificada para producir poli-3-hidroxibutirato, calentar (por ejemplo, pirólisis ultrarrápida) el poli-3-hidroxibutirato para producir ácido crotonico, haciendo reaccionar el ácido crotonico en condiciones adecuadas para formar un éster de crotonato de alquilo inferior en presencia de un catalizador de transesterificación; hacer reaccionar el éster de crotonato de alquilo inferior en condiciones adecuadas para formar un acrilato de alquilo inferior y 2-buteno mediante metátesis cruzada en presencia de un primer catalizador de metátesis con una cantidad suficiente de propileno. El propileno se forma a partir de una reacción de metátesis separada de etileno y 2-buteno en presencia de un segundo catalizador de metátesis y el exceso de propileno se elimina continuamente.

Como se indicó anteriormente, se sabe bien que PHB es térmicamente inestable (Cornelissen et al., páginas 2523-2532, *Fuel*, 87, 2008) y se convierte bajo ciertas condiciones en compuestos intermedios que incluyen ácido crotonico tras calentamiento (véase Kopinke et al., *Polymer Degradation and Stability*, 52: 25-38 (1996)). El ácido crotonico puede procesarse adicionalmente para formar ácido acrílico y ésteres de acrilato. La estabilidad térmica del polímero es típicamente un factor limitante para las aplicaciones termoplásticas, sin embargo, como se describe en este documento, se puede aprovechar para convertir PHB a bajo costo (por ejemplo, a partir de fuentes de biomasa) en ácido crotonico de alta pureza y altos rendimientos. El ácido crotonico en sí mismo tiene mercados limitados, principalmente se usa como un comonomero en sistemas de vinilo donde imparte algunas propiedades hidrófobas a los productos finales. El ácido crotonico se hace reaccionar en condiciones adecuadas para formar un éster de crotonato de alquilo inferior, y haciendo reaccionar el éster de crotonato de alquilo inferior en condiciones adecuadas para formar un acrilato de alquilo inferior y 2-buteno mediante metátesis cruzada en presencia de un primer catalizador con una cantidad suficiente de propileno.

Los productos químicos de base biológica producidos a partir de la biomasa (por ejemplo, ácido crotonico, ácido acrílico, propileno, butano, etc.) pueden utilizarse como materiales de partida para una amplia variedad de aplicaciones. Por ejemplo, el ácido acrílico y sus ésteres se combinan fácilmente consigo mismos u otros monómeros (por ejemplo, acrilamidas, acrilonitrilo, vinilo, estireno y butadieno) al reaccionar en su doble enlace, formando homopolímeros o copolímeros que se usan en la fabricación de diversos plásticos, fabricación de papel y recubrimiento, pinturas para exteriores para madera y mampostería, recubrimientos para aglomerados y materiales de construcción relacionados, floculación de minerales finos y aguas residuales, y tratamiento de aguas residuales, tintas de impresión, pinturas de paredes interiores, pulimentos para pisos, recubrimientos de pisos y paredes, imprimaciones industriales, encolado textil, tratamientos y acabados, impregnación y acabado de cueros y selladores de mampostería, recubrimientos, adhesivos, elastómeros, así como pulidores para pisos y pinturas. El ácido acrílico también se usa en la producción de materiales poliméricos, como el ácido poliacrílico, que es un componente principal de los pañales superabsorbentes.

Asimismo, el propileno es materia prima para una amplia variedad de productos, incluido el polipropileno, un polímero versátil utilizado en el envasado y otras aplicaciones. Es la segunda materia prima petroquímica de mayor volumen después del etileno. El propileno y el benceno se convierten en acetona y fenol a través del proceso del cumeno. El propileno también se usa para producir isopropanol (propan-2-ol), acrilonitrilo, óxido de propileno (epoxipropano) y epíclorhidrina.

Estos productos químicos se utilizan luego para fabricar productos duraderos de base biológica, por ejemplo, productos en las industrias electrónica y automotriz.

5 Comenzando con biomasa que contiene poli-3-hidroxi-butirato (PHB), el componente monomérico obtenido calentando la biomasa de PHB es principalmente ácido trans-crotonico. El ácido crotonico se convierte posteriormente para producir ácido acrílico, ésteres acrílicos y butanol utilizando reacciones de catálisis múltiple de metátesis en tándem. Aquí se describen los materiales y procedimientos necesarios para producir estos diversos productos químicos a partir de biomasa que contiene PHB.

10 De acuerdo con esto, los métodos para producir un ácido crotonico en una biomasa de PHA, haciendo reaccionar el ácido crotonico en condiciones adecuadas para formar un éster de crotonato de alquilo inferior, haciendo reaccionar el éster de crotonato de alquilo inferior en condiciones adecuadas para formar un acrilato de alquilo inferior y 2-buteno mediante metátesis cruzada en presencia de un primer catalizador con una cantidad suficiente de propileno. El propileno se forma por una reacción de metátesis separada de etileno y 2-buteno en presencia de un segundo catalizador, mientras que el exceso de propileno es continuamente retirado. En ciertas realizaciones, los métodos incluyen además hacer reaccionar el éster de crotonato en condiciones adecuadas en presencia de un tercer catalizador para formar un alcohol.

15 La presente descripción también se refiere a un método para producir un ácido crotonico en una biomasa de PHA, hacer reaccionar el ácido crotonico en condiciones adecuadas para formar un éster de crotonato de butilo e hidrogenar el éster de crotonato de butilo para formar dos moles de butanol.

20 En otro aspecto de la invención, se describe un procedimiento para producir un acrilato de alquilo inferior. El procedimiento incluye el crecimiento de una biomasa de PHA genéticamente modificada para producir poli-3-hidroxi-butirato, pirolizando (calentando a alta temperatura, o mediante torrefacción) el poli-3-hidroxi-butirato para producir ácido crotonico, haciendo reaccionar el ácido crotonico en condiciones adecuadas para formar un éster de crotonato de alquilo inferior, haciendo reaccionar el éster de crotonato de alquilo inferior en condiciones adecuadas para formar un acrilato de alquilo inferior y 2-buteno mediante metátesis cruzada en presencia de un primer catalizador con una cantidad suficiente de propileno.

25 En otro aspecto más de la invención, se describe un procedimiento de biorrefinería continuo para la producción de ácido acrílico a partir de biomasa de PHA usando un protocolo de reacción de catálisis múltiple en tándem. El procedimiento incluye cultivar una biomasa de PHA genéticamente modificada para producir poli-3-hidroxi-butirato, pirolizar el poli-3-hidroxi-butirato para producir ácido crotonico, hacer reaccionar el ácido crotonico en condiciones adecuadas para formar un éster de crotonato de alquilo inferior en presencia de un catalizador de esterificación; hacer reaccionar el éster de crotonato de alquilo inferior en condiciones adecuadas para formar un acrilato de alquilo inferior y 2-buteno mediante metátesis cruzada en presencia de un primer catalizador de metátesis con una cantidad suficiente de propileno. El propileno se forma a partir de una reacción de metátesis separada de etileno y 2-buteno en presencia de un segundo catalizador de metátesis y el exceso de propileno se elimina continuamente. Los rendimientos del producto se optimizan separando las reacciones y seleccionando catalizadores apropiados.

35 El método incluye un método de reacción catalítica múltiple en tándem que proporciona un proceso eficiente para la producción de alto rendimiento de ácido acrílico y productos de éster de acrilato derivados de ácido crotonico. En ciertas realizaciones, la biomasa residual, después de la conversión de PHA en ácido crotonico, se utiliza como fuente de energía.

40 Un "catalizador de metátesis" puede usarse solo o en combinación con uno o más catalizadores adicionales. La reacción de metátesis se realiza en presencia de una cantidad catalíticamente eficaz de un catalizador de metátesis. El término "catalizador de metátesis" incluye cualquier catalizador o sistema catalizador que cataliza la reacción de metátesis. La función fundamental de un catalizador de metátesis es facilitar la reordenación de los dobles enlaces carbono-carbono a través de un procedimiento de coordinación de metal activado. Como tales, estos catalizadores pueden utilizarse para acoplar (metátesis cruzada o CM), escindir, abrir anillo (ROM), cerrar anillo (RCM) o polimerizar (ROMP) una gama de compuestos olefínicos. Catalizadores de metátesis particularmente útiles son los catalizadores de Grubbs que se basan en un átomo de rutenio central rodeado por cinco ligandos: dos grupos neutros donantes de electrones, dos grupos monoaniónicos y un grupo alquilideno. La última generación de catalizadores de metátesis de rutenio tiene la ventaja de poder manejarse al aire, reaccionar a temperaturas relativamente bajas y son tolerantes a diversos grupos funcionales olefínicos que incluyen grupos próticos tales como alcoholes y ácidos, a la vez que mantienen una alta actividad catalizadora (S. Connon, S. Bleichert (2003), Ang. Chem. Int. Ed., 42, página 1900).

50 Estos catalizadores sintéticos representan una tecnología de avanzada que permite que la química de la metátesis se aplique a moléculas funcionales tales como ácidos grasos derivados de aceites vegetales insaturados, ésteres de ácidos grasos, ácidos grasos de hidroxilo y ésteres de poliol insaturados. Ejemplos de catalizadores de metátesis incluyen catalizadores de carbeno metálicos basados en metales de transición, por ejemplo, rutenio, molibdeno, osmio, cromo, renio y tungsteno. Ejemplos de catalizadores de metátesis basados en rutenio, catalizadores de metátesis basados en rutenio, denominados generalmente catalizadores de Grubbs, son particularmente útiles en la metátesis de olefinas. Los catalizadores de metátesis incluyen los "catalizadores de primera generación" originales, los "catalizadores de segunda generación" (Véase Schrodi y Pederson, Aldrichimica ACTA Vol 40 (2) 45-52 (2007) y la patente de Estados Unidos No. 7.322.9758) y "análogos de Hoveyda-Grubbs". Estos catalizadores son especialmente útiles en reacciones con compuestos oxigenados.

Muchos factores influyen en las rutas catalíticas complejas de la metátesis de olefinas. Las tecnologías catalíticas de metátesis actuales tienen limitaciones que incluyen la desactivación catalítica, baja rotación catalítica, inestabilidad catalítica y degradación y baja selectividad, por nombrar algunas. Estas limitaciones dan como resultado un bajo rendimiento del producto y un aumento de los costos.

5 El recambio catalítico es la cantidad de moles de sustrato que una mol de catalizador puede convertir antes de inactivarse. Se ha estimado que para que la metátesis de olefinas produzca suficiente producto en un procedimiento de biorrefinería económicamente viable, la rotación catalítica debería ser mayor de cincuenta mil. (Burdett et al., *Organometallics* 23: 2027-2047 (2004)).

10 La desactivación del catalizador de metátesis a menudo implica la inhibición de la olefina terminal con la acumulación de productos insaturados. La limitación de la desactivación del catalizador de metátesis al convertir etileno y butileno en propileno se lleva a cabo tratando previamente o acondicionando el catalizador con 2-buteno cis, mientras que el pretratamiento con etileno se correlaciona con la desactivación catalítica. (Véase Lysenko et al., *J. of Organometallic Chem.*, 691: 5197-5203 (2006)).

15 Las reacciones y procedimientos catalíticos múltiples en tándem descritos en la presente memoria permiten la selectividad, la desactivación reducida y otras condiciones de reacción que aumentan el rendimiento del producto de ácido acrílico. El ácido crotonico es un ácido carboxílico con un doble enlace entre los carbonos C2 y C3. Los ácidos carboxílicos libres y el etileno desactivan los catalizadores de metátesis. Al convertir el ácido crotonico en ácido acrílico en un procedimiento catalítico múltiple en tándem, los catalizadores de metátesis son específicos de la reacción y no están expuestos al ácido carboxílico libre o al etileno. Cada etapa de la reacción global se separa y optimiza para un alto rendimiento.

20 En la primera etapa de un ejemplo de procedimiento ilustrativo del procedimiento catalítico múltiple en tándem, el ácido crotonico se convierte en el éster de crotonato de butilo usando un catalizador de esterificación. En la segunda etapa, el etileno y el 2-buteno se convierten en propileno usando un catalizador que no es sensible a la desactivación por etileno. La selectividad de la reacción se maximiza mediante la eliminación continua del propileno que limita las reacciones secundarias no deseadas. Finalmente, en la tercera etapa, el propileno se hace reaccionar con el crotonato de butilo usando otro catalizador de metátesis específico diferente para producir acrilato de butilo y 2-buteno.

25 La Figura 12 detalla la reacción de metátesis general del propileno para producir butano y etileno. El punto de partida para el ciclo catalítico es el carbeno metálico (I). Este reacciona con propileno para generar el compuesto intermedio de metalociclobutano (II). Este anillo de cuatro miembros se fragmenta luego en la dirección opuesta para liberar etileno y crear un nuevo carbeno metálico (III), que reacciona con otro equivalente de propileno. La fragmentación del metalociclobutano (IV) resultante produce 2-buteno y regenera la carabina metálica (I) inicial que luego vuelve a entrar en el ciclo catalítico.

30 En ciertas realizaciones de la invención, se usa un catalizador de metátesis en la reacción en ausencia de etileno u otro producto desactivante o producto secundario. En otras realizaciones, un catalizador de metátesis es insensible a etileno u otros compuestos desactivantes. En otras realizaciones, el catalizador de metátesis reacciona con un alqueno asimétrico, por ejemplo, propileno.

35 Las tasas de selectividad y de reacción de cada etapa del procedimiento descrito en este documento pueden optimizarse mediante la selección del catalizador de metátesis apropiado. Los catalizadores que tienen una actividad deseable en cada etapa de la reacción catalítica múltiple en tándem bajo condiciones de reacción variables pueden diseñarse y probarse comparando la tasa de formación del producto. Se están desarrollando nuevos catalizadores de metátesis para satisfacer la necesidad de la producción industrial de productos bioquímicos en los que los catalizadores son más activos y realizan transformaciones más difíciles de forma selectiva en una variedad de condiciones de reacción con una reactividad única y velocidades de iniciación adaptadas. Estos catalizadores de metátesis se adaptarán a la estabilidad, reactividad y selectividad necesarias para la reacción de metátesis deseada. También se contemplan aquí, el desarrollo de nuevos catalizadores de metátesis que mejoran la reactividad, selectividad o velocidad de iniciación de los métodos descritos en este documento. Es posible optimizar el catalizador de metátesis para reacciones específicas cambiando los grupos de ligandos unidos al centro metálico. Por ejemplo, se encontró que dependiendo del tipo de ligandos de fosfina separables utilizados en los catalizadores de Grubbs, la velocidad de iniciación de la reacción de metátesis podía controlarse. Esto es importante cuando se considera que, dependiendo de la aplicación, es ventajoso emplear catalizadores que se inicien de forma más lenta (por ejemplo, para reacciones de ROMP) o más rápidamente (por ejemplo, reacciones de baja temperatura).

Las fuentes comerciales de catalizadores de metátesis incluyen Sigma-Aldrich, Materia and Elevance (publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos No. US 2009/0264672).

55 Los ejemplos de catalizadores de metátesis adicionales incluyen, sin limitación, complejos de carbeno metálico seleccionados del grupo que consiste en molibdeno, osmio, cromo, renio y tungsteno. El término "complejo" se refiere a un átomo de metal, tal como un átomo de metal de transición, con al menos un ligando o agente complejante coordinado o unido a él. Tal ligando típicamente es una base de Lewis en complejos de metal carbeno útiles para metátesis de alquino o alqueno. Los ejemplos típicos de tales ligandos incluyen fosfinas, haluros y carbenos

estabilizados. Algunos catalizadores de metátesis pueden emplear metales plurales o cocatalizadores metálicos (por ejemplo, un catalizador que comprende un haluro de tungsteno, un compuesto de tetraalquil estaño y un compuesto de organoaluminio).

5 Se puede usar un catalizador inmovilizado para el procedimiento de metátesis. Un catalizador inmovilizado es un sistema que comprende un catalizador y un soporte, el catalizador asociado con el soporte. Pueden darse asociaciones a modo de ejemplo entre el catalizador y el soporte por medio de enlaces químicos o interacciones débiles (por ejemplo, enlaces de hidrógeno, interacciones donador-aceptor) entre el catalizador, o cualquiera de sus porciones, y el soporte o cualquiera de sus porciones. Se pretende que el soporte incluya cualquier material adecuado para soportar el catalizador. Típicamente, los catalizadores inmovilizados son catalizadores en fase sólida que actúan sobre reactivos y
10 productos en fase líquida o gaseosa. Los ejemplos de soportes son polímeros, sílice o alúmina. Tal catalizador inmovilizado se puede usar en un procedimiento de flujo. Un catalizador inmovilizado puede simplificar la purificación de productos y la recuperación del catalizador de modo que el reciclado del catalizador puede ser más conveniente.

El procedimiento de metátesis puede realizarse en cualquier condición adecuada para producir los productos de metátesis deseados. Por ejemplo, se pueden seleccionar la estequiometría, la química de coordinación entre el
15 catalizador y los sustratos, la atmósfera, el disolvente, la temperatura y la presión para producir un producto deseado y para minimizar los subproductos indeseables. El procedimiento de metátesis puede realizarse en una atmósfera inerte. De forma similar, si el reactivo de olefina se suministra como un gas, se puede usar un diluyente gaseoso inerte. La atmósfera inerte o diluyente gaseoso inerte es típicamente un gas inerte, lo que significa que el gas no interacciona con el catalizador de metátesis para impedir sustancialmente la catálisis. Por ejemplo, los gases inertes particulares se
20 seleccionan del grupo que consiste en helio, neón, argón, nitrógeno y combinaciones de los mismos.

De forma similar, si se usa un disolvente, el disolvente elegido puede seleccionarse para que sea sustancialmente inerte con respecto al catalizador de metátesis. Por ejemplo, los disolventes sustancialmente inertes incluyen, sin limitación, hidrocarburos aromáticos, tales como benceno, tolueno, xilenos, etc.; hidrocarburos aromáticos halogenados, tales como clorobenceno y diclorobenceno; disolventes alifáticos, que incluyen pentano, hexano, heptano, ciclohexano, etc.; y
25 alcanos clorados, tales como diclorometano, cloroformo, dicloroetano, etc.

En ciertas realizaciones, la reacción de metátesis también puede realizarse sin el uso de disolventes.

En otras realizaciones, se puede añadir un ligando a la mezcla de reacción de metátesis. En muchas realizaciones que usan un ligando, el ligando se selecciona para que sea una molécula que estabilice el catalizador, y de este modo puede proporcionar un número de renovación aumentado para el catalizador. En algunos casos, el ligando puede alterar
30 la selectividad de la reacción y la distribución del producto. Los ejemplos de ligandos que pueden usarse incluyen ligandos de base de Lewis, tales como, sin limitación, trialquilfosfinas, por ejemplo, triciclohexilfosfina y tributilfosfina; triarilfosfinas, tales como trifenilfosfina; diarilalquilfosfinas, tales como, difenilciclohexilfosfina; piridinas, tales como 2,6-dimetilpiridina, 2,4,6-trimetilpiridina; así como otros ligandos básicos de Lewis, tales como óxidos de fosfina y fosfinitos. Los aditivos también pueden estar presentes durante la metátesis que aumentan la vida útil del catalizador.

35 Cualquier cantidad útil del catalizador de metátesis seleccionado se puede usar en el procedimiento. Por ejemplo, la relación molar del reactivo con respecto al catalizador puede variar de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 10.000.000:1 o de aproximadamente 50:1 a 500.000:1.

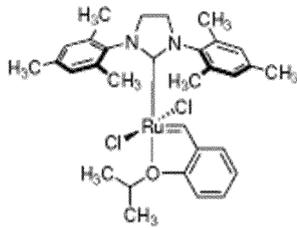
La temperatura de la reacción de metátesis puede ser una variable de control de la velocidad en la que la temperatura se selecciona para proporcionar un producto deseado a una velocidad aceptable. La temperatura de la metátesis puede
40 ser mayor que -40°C , puede ser mayor que aproximadamente -20°C , y típicamente es mayor que aproximadamente 0°C o mayor que aproximadamente 20°C . Típicamente, la temperatura de la reacción de metátesis es inferior a aproximadamente 150°C , típicamente inferior a aproximadamente 120°C . Un ejemplo de un intervalo de temperatura para la reacción de metátesis varía desde aproximadamente 20°C hasta aproximadamente 120°C .

La reacción de metátesis se puede ejecutar a cualquier presión deseada. Típicamente, será deseable mantener una
45 presión total que sea lo suficientemente alta para mantener el reactivo de metátesis cruzada en solución. Por lo tanto, a medida que aumenta el peso molecular del reactivo de metátesis cruzada, el intervalo de presión inferior típicamente disminuye a medida que aumenta el punto de ebullición del reactivo de metátesis cruzada. La presión total puede seleccionarse para que sea mayor que aproximadamente 10 kPa, en algunas realizaciones mayor que aproximadamente 30 kPa, o mayor que aproximadamente 100 kPa. Típicamente, la presión de reacción no es mayor de
50 aproximadamente 7.000 kPa, en algunas realizaciones no mayor de aproximadamente 3.000 kPa. Un ejemplo de intervalo de presión para la reacción de metátesis es de aproximadamente 100 kPa hasta aproximadamente 3.000 kPa. Además, el pH puede oscilar entre aproximadamente 2-10.

En algunas realizaciones, la reacción de metátesis es catalizada por un sistema que contiene tanto un componente metálico de transición como no de transición. El número más activo y más grande de sistemas de catalizadores de metátesis se deriva de los metales de transición del Grupo VI A, por ejemplo, tungsteno y molibdeno.
55

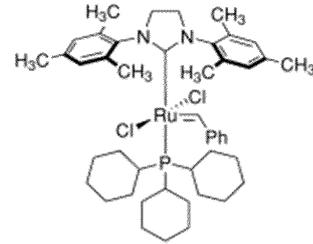
El uso del catalizador de metátesis en la metátesis cruzada de olefina permite la selectividad del producto y la reactividad de la olefina. (A. Chatterjee et al., J. Am. Chem. Soc. 125: 11360-11370 (2003)).

Ejemplos de catalizadores incluyen, pero no se limitan a, los siguientes:



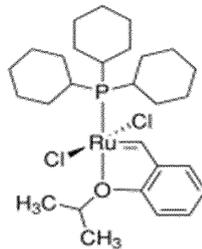
Catalizador de Hoveyda-Grubbs de 2da generación

(1,3-Bis-(2,4,6-trimetilfenil)-2-imidazolidinilideno)dicloro(o-isopropoxifenilmetileno)rutenio



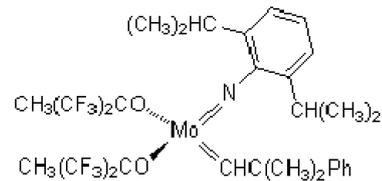
Catalizado de Grubbs de 2da generación

1,3-Bis-(2,4,6-trimethylphenyl)-2-(imidazolidinilideno) (diclorofenilmetileno)(triciclohexilfosfina)rutenio



Catalizador de Hoveyda-Grubbs de primera generación

1,3-Bis-(2,4,6-trimetilfenil)-2-(imidazolidinilideno) (diclorofenilmetileno) (triciclohexilfosfina)rutenio



Catalizador de Schrock

2,6-Diisopropilfenilimidoneofilideno molibdeno(VI) bis(hexafluoro-t-butóxido)

Proceso continuo de biorrefinería

Las realizaciones útiles del procedimiento de biorrefinería continuo son la producción de ácidos acrílicos de base biológica y productos relacionados derivados por reacciones catalíticas múltiples en tándem a partir de ácido crotonico derivado de biomasa de PHA. Este procedimiento es una conversión altamente eficiente de carbono de una fuente biológica en ácido acrílico y productos relacionados para su uso en una variedad de aplicaciones.

Biomasa residual

Como se usa en el presente documento, los "líquidos de pirólisis" se definen como un fluido de baja viscosidad con hasta 15-20% de agua, que contienen típicamente azúcares, aldehídos, furanos, cetonas, alcoholes, ácidos carboxílicos y ligninas. También conocido como bioaceite, este material se produce por pirólisis, típicamente pirólisis rápida de biomasa a una temperatura que es suficiente para descomponer al menos una parte de la biomasa en gases y líquidos recuperables que pueden solidificar al reposar. En algunas realizaciones, la temperatura que es suficiente para descomponer la biomasa es una temperatura entre 400°C y 800°C.

En otras realizaciones, el procedimiento incluye la torrefacción de la biomasa residual. En ciertas realizaciones, la torrefacción incluye mantener la biomasa residual a una temperatura de 200°C a 350°C. En otras realizaciones, la torrefacción incluye mantener la biomasa residual a una temperatura durante un período de tiempo de 10 a 30 minutos, por ejemplo, 12 minutos, 13 minutos, 14 minutos, 15 minutos, 16 minutos, 17 minutos, 18 minutos, 19 minutos, 20 minutos, 21 minutos, 22 minutos, 23 minutos, 24 minutos, 25 minutos, 26 minutos, 27 minutos, 28 minutos, 29 minutos o más de 30 minutos.

Tal como se usa en la presente memoria, "torrefacción" se refiere al procedimiento de torrefacción, que es un término reconocido en la técnica que se refiere al secado de biomasa. El procedimiento típicamente implica calentar una biomasa en un intervalo de 200-350°C, durante un período de tiempo relativamente largo (por ejemplo, 10-30 minutos), típicamente en ausencia de oxígeno. El procedimiento da como resultado una biomasa torrefactada que tiene un contenido de agua inferior al 7% en peso de la biomasa. La biomasa torrefactada puede procesarse posteriormente.

Aplicaciones

Los productos químicos de base biológica producidos a partir de la biomasa (por ejemplo, ácido crotonico, ácido acrílico, propileno, butano, etc.) pueden utilizarse como materiales de partida para una amplia variedad de aplicaciones. Por ejemplo, el ácido acrílico y sus ésteres se combinan fácilmente consigo mismos u otros monómeros (por ejemplo, acrilamidas, acrilonitrilo, vinilo, estireno y butadieno) al reaccionar en su doble enlace, formando homopolímeros o copolímeros que se usan en la fabricación de diversos plásticos, fabricación y recubrimiento de papel, pinturas para exteriores para madera y mampostería, recubrimientos para aglomerados y materiales de construcción relacionados,

floculación de minerales finos y aguas residuales, y tratamiento de aguas servidas, tintas de impresión, pinturas de paredes interiores, pulimentos para pisos, recubrimientos de pisos y paredes, imprimaciones industriales, encolado textil, tratamiento y acabado, impregnación y acabado de cuero y selladores de mampostería, recubrimientos, adhesivos, elastómeros, así como pulidores para suelos y pinturas. El ácido acrílico también se usa en la producción de materiales poliméricos, como el ácido poliacrílico, que es un componente principal de los pañales superabsorbentes.

Asimismo, el propileno es materia prima para una amplia variedad de productos que incluyen polipropileno, un polímero versátil usado en envases y otras aplicaciones. Es la segunda materia prima petroquímica de mayor volumen después del etileno. El propileno y el benceno se convierten en acetona y fenol a través del proceso de cumeno. El propileno también se usa para producir isopropanol (propan-2-ol), acrilonitrilo, óxido de propileno (epoxipropano) y epíclorohidrina.

10 Ejemplos

La presente tecnología se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, que no deben interpretarse como limitantes de ninguna manera.

Métodos experimentales

15 Medición de productos de degradación térmica por pirólisis-cromatografía de gases-espectroscopía de masas (Py-GC-MS)

Para identificar y semicuantificar los compuestos monoméricos generados a partir de biomasa seca mientras se calienta a diversas temperaturas, se usó un GC-MS Agilent 7890A/5975 equipado con un pirolizador Frontier Lab PY-2020iD. Para esta técnica, se pesa una muestra en una copa de acero y se carga en el automuestreador del pirolizador. Cuando se inicia el pirolizador y GC-MS, la copa de acero se coloca automáticamente en el pirolizador que se ha ajustado a una temperatura específica. La muestra se mantiene en el pirolizador durante un corto período de tiempo mientras que los volátiles son liberados por la muestra. Los compuestos volátiles se barren con gas de helio en la columna GC donde se condensan en la columna que está a temperatura ambiente. Una vez que termina la pirólisis, la columna de GC se calienta a una velocidad determinada para eluir los volátiles liberados de la muestra. Luego, los compuestos volátiles se barren usando gas de helio en un detector de ionización de electrones/espectros de masas (intervalo de masa 10-700 daltons) para identificación y cuantificación.

Para los siguientes ejemplos, se pesaron 200-400 µg de biomasa seca en una copa de acero del pirolizador usando una microbalanza. La copa se cargó en el automuestreador del pirolizador. El pirolizador fue programado para calentarse a una temperatura de 300-350°C durante 0,2-1 minutos. La columna de GC utilizada en los ejemplos era una columna capilar Frontier Lab Ultra Alloy o una columna HP-5MS (longitud 30 m, ID 0,25 µm, grosor de película 0,25 µm). El GC se programó entonces para calentar desde la temperatura ambiente hasta 70°C durante 5 minutos, luego a 240°C a razón de 10°C/min durante 4 min y finalmente a 270°C a razón de 20°C/min durante 1,5 min. El tiempo total de ejecución del GC fue de 25 minutos. Los picos que se muestran en los cromatogramas se identificaron por la mejor probabilidad de coincidencia con los espectros de una biblioteca espectral de masas NIST.

Ejemplo 1: Generación de ácido crotónico de base biológica procedente de la pirólisis de tabaco genéticamente modificado que expresa poli-3-hidroxitirato.

En este ejemplo, se muestra que el calentamiento de biomasa de plantas modificadas genéticamente que contiene poli-3HB genera monómero de ácido crotónico de base biológica. El tabaco se modificó genéticamente para expresar poli-3HB y se cultivó en condiciones de invernadero produciendo biomasa vegetal que contenía 10% de poli-3HB con base en hojas secas. Las hojas de tabaco se retiraron de sus plantas, se secaron hasta < 5% en peso de humedad y se molieron manualmente hasta un tamaño de partícula de < 1 mm. Una porción del polvo de hoja de tabaco se mezcló a continuación con una suspensión acuosa de cal ($\text{Ca}(\text{OH})_2$ al 95%+ Sigma Aldrich) y se secó a 110°C en un horno antes de someterse a Py-GC-MS a 350°C. La concentración final de cal en la biomasa de tabaco seco fue del 5% en peso. Las Figuras 2 y 3 muestran las gráficas de Py-GC-MS para el tabaco sin cal y con el catalizador de cal, mientras que las Tablas 1 y 2 enumeran los tiempos de retención del pico del cromatograma y las coincidencias de la biblioteca espectral de masas. Los resultados muestran que a 350°C, los compuestos principales generados calentando el tabaco con 10% de poli-3HB eran CO_2 , ácido acético y ácido crotónico. Los primeros dos compuestos volátiles se originaron a partir de polisacáridos y hemicelulosas presentes en la planta de tabaco, mientras que el ácido crotónico (cis y trans) se originó a partir del poli-3HB. Cuando se agregó cal al tabaco + poli(3HB), el efecto general fue aumentar la cantidad relativa de CO_2 generado. Se ha demostrado que la adición de iones metálicos (potasio, calcio y litio) a la madera aumenta las velocidades de ciertas reacciones de pirólisis, especialmente las reacciones de descarboxilación de lignina, hemicelulosa y celulosa (G. Richards y G. Zheng, J. of Anal. and Applied Pyrolysis, 21 (1991), página 133). Esto podría explicar el gran aumento de CO_2 generado durante la pirólisis del tabaco después de la adición del catalizador de cal. El catalizador también pareció suprimir la generación de picos con tiempos de retención en la región de 9-10 minutos que se identificaron como compuestos de tipo éster y alcohol.

55 Tabla 2. Tiempos de retención de picos de GC-MS y compuestos generados durante la pirólisis a 350°C de tabaco con 10% de poli-3HB.

ES 2 647 611 T3

Pico #	Tiempo de retención (min)	ID del pico
1	1,781	CO ₂
2	1,852	CO ₂
3	2,874	Ácido Acético
4	3,120	1-Hidroxi-2-propanona
5	5,132	Ácido cis-crotónico
6	6,150	Ácido trans-crotónico
7	6,810	2-Metil-1,3-butanediol
8	7,200	2-Hidroxi-3-metil-2-ciclopenten-1-ona
9	7,725	Ciclopropilmetanol
10	9,575	Éster etílico del ácido ciclopropanocarboxílico
11	10,279	3-Etil-3-pentanol
12	12,508	2,6,10-Trimetil-14-etilen-14-pentadeceno
13	13,125	Ácido hexadecanoico
14	14,178	Compuesto de metano-azuleno
15	16,003	1-Acetil-2-piridinil-2,3,4,5-tetra-hidropirrol
16	17,940	Octacosano

Tabla 3. Tiempos de retención de picos de GC-MS y compuestos generados durante la pirólisis a 350°C de tabaco con 10% de poli-3HB + 5% de cal.

Pico #	Tiempo de retención (min)	ID del pico
1	1,779	CO ₂
2	1,822	CO ₂
3	2,102	CO ₂
4	2,505 - 2,798	Ácido acético
5	3,091	1-Hidroxi-2-propanona
6	5,839	Ácido trans-crotónico
7	6,792	1-Vinil pirazol
8	7,150	2-Hidroxi-3-metil-2-ciclopenten-1-ona
9	7,712	Ciclopropilmetanol
10	9,287	Indol
11	9,400	2-Metoxi-4-vinilfenol
12	9,637	2,6-dimetoxifenol
13	12,507	2,6,10-Trimetil-14-etilen-14-pentadeceno
14	13,117	Ácido hexadecanoico

15	14,169	Hexadecanamida
16	17,353 - 19,074	Eicosano, Tricontano, Octacosano

Ejemplo 2: Hidrólisis lignocelulósica seguida por la generación de ácido crotonico de base biológica procedente de la pirólisis del tabaco genéticamente modificado que expresa poli-3-hidroxitirato.

5 En este ejemplo, se describe un procedimiento en el que la biomasa vegetal que contiene poli-3HB se procesa primero para eliminar azúcares solubles y otros componentes y luego se calienta para generar ácido crotonico de base biológica. El tabaco modificado para expresar poli-3HB al 10% en peso en la hoja de la planta se cosechó después de crecer hasta tamaño completo en un invernadero. Se recogió un total de 100 g de hojas de tabaco secas que contenían aproximadamente 10 g de PHA y se molieron hasta un tamaño < 1 mm. Las hojas molidas se sometieron entonces a un procedimiento de hidrólisis estándar usando ácido diluido y enzima para producir azúcares solubles (40 g), solubles no
10 identificados (20 g) y biomasa seca residual (40 g). La biomasa residual se analizó mediante GC (véase Doi, Microbial Polyesters, John Wiley & Sons, 1990, página 24) que indica un contenido total de PHA de aproximadamente 8 g (80% de recuperación de PHA). Este residuo seco se sometió a pirólisis-GC a 350°C produciendo ácido crotonico con una recuperación del 90% y una pureza de > 95% (cis y trans combinados).

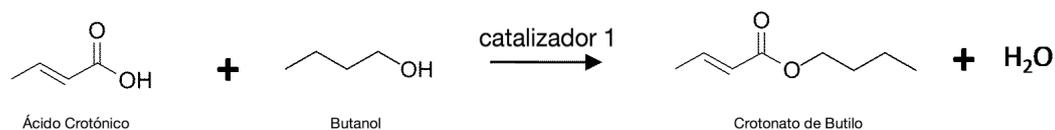
15 Ejemplo 3: Generación de éster de ácido acrílico de base biológica a partir de la pirólisis de una biomasa genéticamente modificada que produce poli-3-hidroxitirato seguido de metátesis de ácido crotonico.

En el ejemplo anterior, se mostró cómo la biomasa + poli-3HB podría usarse para generar ácido crotonico de base biológica calentando a temperaturas en las que se inicia la descomposición térmica del poli-3HB. El ácido crotonico recuperado a partir de este procedimiento podría transformarse además en productos químicos intermedios valiosos mediante el uso de reacciones de metátesis cruzada. Este ejemplo detalla un método para convertir ácido crotonico en ésteres de ácido acrílico usando un procedimiento de catálisis múltiple en tándem.
20

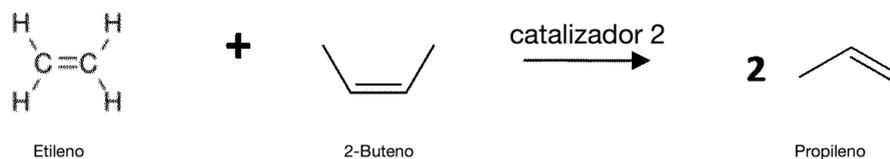
La metátesis cruzada es el acoplamiento de dos reactivos que contienen enlaces de carbono insaturados y se ha limitado históricamente a compuestos de partida que no tienen ningún grupo funcional tal como olefinas simples (etileno, propileno, etc.). Los catalizadores orgánicos a base de rutenio que ahora están siendo fabricados por Materia (patentes de Estados Unidos Nos. 6.620.955 y 7.026.495) y desarrollados por Elevance (solicitud de patente de Estados Unidos No. 2009/0264672) representan una tecnología innovadora que permite aplicar la química de metátesis cruzada a moléculas funcionales tales como ácidos grasos derivados de aceites vegetales insaturados, ésteres de ácidos grasos, ácidos grasos hidroxilicos y ésteres de poliol insaturados. El ácido crotonico es otra molécula (un ácido carboxílico de cadena corta insaturada) que se presta a esta nueva forma de metátesis cruzada con olefinas tales como etileno, incluido el etileno derivado de fuentes biológicas procedente de la deshidratación del etanol, para producir ésteres de ácido acrílico. Un desafío, sin embargo, en la reacción de monómero de etileno con catalizadores de metátesis es la propensión del etileno a desactivar o degradar el catalizador, lo que conduce a bajas tasas de conversión y pérdida de rendimiento (Z. Lysenko et al. (2006), J. of Organometallic Chem., 691, página 5197; X. Lin et al. (2010), J. of Molecular Catalysis A: Chemical, 330, página 99; K. Burdett et al. (2004), Organometallics, 23, página 2027). Esto es especialmente importante cuando se desarrollan aplicaciones industriales que usan catalizadores de metátesis para la producción química de base biológica.
35

Se describe a continuación la utilización un procedimiento de catálisis múltiple en tándem en el que el catalizador de metátesis primario (catalizador # 3 más adelante) no está expuesto a etileno. En la primera etapa del procedimiento, el ácido crotonico se convierte en el éster de crotonato de butilo usando un catalizador de esterificación conocido por los expertos en la técnica, pero podría incluir ácidos, hidróxidos de metales alcalinos, alcóxidos y carbonatos, enzimas y bases no iónicas, tales como aminas, amidinas, guanidinas y triamino(imino)fosforanos. La reacción de esterificación también puede proceder a través de la conversión del ácido crotonico en cloruro de crotonilo y luego se hace reaccionar con un alcohol. Una ventaja de la última reacción es que no es reversible. En la segunda etapa, el etileno y el 2-buteno se convierten en propileno usando un catalizador que no es sensible a la desactivación por etileno, tal como los catalizadores de alquilideno-molibdeno o los de tungsteno-alquilideno de Schrock (Schrock et al. (1988), J. Am. Chem Soc., 110, página 1423). La selectividad de la reacción se maximiza mediante la eliminación continua del propileno que limita las reacciones secundarias no deseadas. Finalmente, en la tercera etapa, el propileno se hace reaccionar con el crotonato de butilo usando un catalizador de segunda generación de Hoveyda-Grubb (tal como (1,3-bis(2,4,6-trimetilfenil)-2-imidazolidinilideno)dicloro(o-isopropoxifenilmetileno)rutenio) para producir acrilato de butilo y 2-buteno. Los catalizadores de este tipo se usan para hacer reaccionar sustratos altamente deficientes en electrones a presión atmosférica y temperaturas de 5-30°C. En este esquema de reacción, el catalizador de metátesis nunca se expone al etileno y, por lo tanto, es capaz de mantener las altas velocidades de reacción y los altos rendimientos necesarios para los procedimientos bioquímicos industriales. Las reacciones de catálisis múltiple en tándem para transformar el ácido crotonico en acrilato de butilo se muestran a continuación:
40
45
50

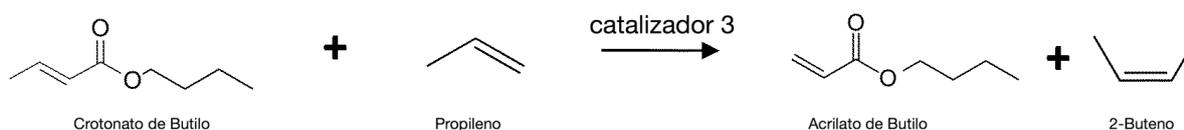
Etapas #1:



Etapa #2:



Etapa #3:



5

La clave de la transformación anterior es la conversión del ácido crotonico al éster (los catalizadores de metátesis pueden ser inactivados por ácidos carboxílicos libres) y el uso de propileno y no de etileno para la conversión del crotonato de butilo en acrilato de butilo. El uso de otros alcoholes, como el etanol, produciría otros ésteres de ácido acrílico.

10 El 2-buteno producido mediante la reacción de la Etapa (3) se puede usar como materia prima química para la conversión a butadieno o mediante metátesis con etileno a propileno según la reacción de la Etapa (2). En el caso de que el etileno se derive de etileno producido de manera renovable, el propileno resultante sería un producto químico completamente de base biológica.

15 Para llevar a cabo las reacciones anteriores en una escala de laboratorio, se podrían tomar 5 g de biomasa vegetal o microbiana que contenga poli-3HB tal como la descrita en el Ejemplo 1 y calentar a presión atmosférica bajo atmósfera nitrógeno a 300°C. Los vapores se enfrían luego con solidificación directa de ácido crotonico en una superficie fría mantenida a 20°C (el punto de fusión de ácido crotonico es 70°C). Aproximadamente 3 g de ácido crotonico se recuperan para la posterior catálisis múltiple en tándem como se describe en las reacciones anteriores. La Figura 4 muestra un diagrama de flujo del proceso (PFD) que ilustra la producción industrial integrada de acrilato y propileno a partir de ácido crotonico y materiales de partida de etileno mientras que,

20

La Figura 5 muestra la esterificación e hidrogenación de ácido crotonico.

Ejemplo 4: Generación de butanol de base biológica a partir de la pirólisis de una biomasa genéticamente modificada que produce poli-3-hidroxibutirato seguido de hidrogenación directa del ácido crotonico (ejemplo de referencia).

25 El siguiente ejemplo describe la generación de ácido crotonico de base biológica a partir de biomasa que contiene poli-3HB y luego la conversión del ácido crotonico en butanol de base biológica mediante hidrogenación. Se calientan 5 g de biomasa microbiana o vegetal que contiene poli-3HB a presión atmosférica bajo atmósfera de nitrógeno a 300°C. Los vapores generados se enfrían con solidificación directa de ácido crotonico en una superficie fría mantenida a 20°C (el punto de fusión del ácido crotonico es de 70°C). Aproximadamente 3 g de ácido crotonico se recuperan para la hidrogenación posterior. Un autoclave de 50 mL se carga con 5 g de agua, 2 g de ácido crotonico y 0,3 g de un catalizador de Ru-Sn-Pt como se describe en el Ejemplo 3 de la patente de Estados Unidos No. 6.495.730. Después de purgar el autoclave con nitrógeno, se introduce hidrógeno gaseoso seguido de la presurización del autoclave a 20 bar y la elevación de la temperatura a 180°C. Después de alcanzar la temperatura objetivo, el reactor se presuriza adicionalmente a 150 bar y se permite que la reacción de hidrogenación avance durante 6 horas. Una vez completada la reacción, el reactor se enfría y se despresuriza, seguido de purga con nitrógeno. El contenido del autoclave se descarga y el catalizador se separa por decantación. El catalizador se lava con agua DI adicional que se combina con el sobrenadante. Se filtra una alícuota de sobrenadante y se analiza por HPLC para determinar el % de conversión de ácido crotonico y el % de rendimiento de butanol sobre una base molar. Alternativamente, el material de alimentación para la hidrogenación anterior podría ser un éster de crotonato tal como el crotonato de butilo formado en el Ejemplo 3. El crotonato de butilo formaría después 2 moles de butanol después de la hidrogenación. La reacción se muestra a continuación:

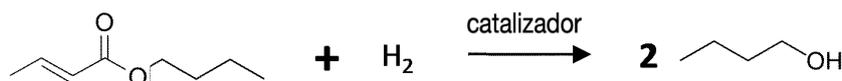
30

35

40

Hidrogenación

Reacción:



La Figura 5 muestra el procedimiento industrial integrado para la producción de butanol a través de la hidrogenación y la esterificación del ácido crotonico.

5 Ejemplo 5: Generación de anhídrido maleico de base biológica mediante pirólisis de una biomasa genéticamente modificada que produce poli-3-hidroxi-butarato seguido de oxidación catalítica (ejemplo de referencia).

Este ejemplo muestra cómo el anhídrido maleico de base biológica (MAN) puede generarse a partir de ácido crotonico de base biológica mediante oxidación catalítica. Se someten 5 g de biomasa microbiana o vegetal que contiene poli-3HB a calentamiento a presión atmosférica bajo atmósfera de nitrógeno a 300°C. Los vapores generados se enfrían con solidificación directa de ácido crotonico en una superficie fría mantenida a 20°C (el punto de fusión del ácido crotonico es de 70°C). Aproximadamente 3 g de ácido crotonico se recuperan para su posterior oxidación. El ácido crotonico se alimenta con una bomba a través de un rotámetro para líquido en la parte superior de un vaporizador calentado eléctricamente donde se pone en contacto con aire alimentado a través de un rotámetro separado en la parte inferior del vaporizador. El vaporizador funciona de 150°C a 200°C y se rellena con lana de acero inoxidable para garantizar una buena transferencia de calor y una vaporización y mezcla eficaces del ácido crotonico y el aire. La mezcla se envía luego a un calentador previo calentado eléctricamente, también se rellena con lana de acero inoxidable, y se calienta a 250°C a 300°C. La corriente de vapor se envía a un lecho de catalizador fijo que consiste en gránulos de alúmina de 1/8 impregnados con pentóxido de vanadio (como se describe con más detalle en Church, JM y Bitha, P., "Catalytic air oxidation of crotonaldehyde to maleic anhydride", I&EC Product Research and Development, Vol. 2 (1), 1963, páginas 61-66) contenidos dentro de un recipiente de reactor encamisado. El reactor se calienta eléctricamente para la puesta en marcha y se enfría utilizando aceite circulante para transferencia de calor para mantener las condiciones del reactor. Los gases de salida se alimentan a un separador ciclónico refrigerado por agua para permitir que el anhídrido maleico y el ácido crotonico se condensen. Cualquier producto no condensado y aún presente en los gases ligeros se absorbe luego en una torre empacada con agua fría circulante utilizada como líquido de lavado de contacto directo. Al final de la ejecución, el producto líquido del separador de ciclón y el líquido de lavado se recogen y analizan para calcular el rendimiento de MAN (como porcentaje del valor teórico) y la conversión de ácido crotonico. La Figura 6 muestra un diagrama esquemático del procedimiento para la conversión de ácido crotonico en anhídrido maleico con más detalle.

Ejemplo 6: generación de 8-valerolactona a partir de un microbio genéticamente modificado que produce poli-5HV (ejemplo de referencia).

30 Se preparó biomasa microbiana que contenía poli-(5-valerolactona) (poli-5HV) mediante un procedimiento de fermentación usando los procedimientos descritos en el documento WO 2010/068953. Una cepa de *E. coli* genéticamente modificada diseñada específicamente para la producción de poli-5HV a partir de jarabe de glucosa como fuente de alimentación de carbono. Después de que se completó la fermentación, se mezclaron 100 g del caldo de fermentación (por ejemplo, biomasa de P5HV) con una suspensión acuosa que contenía 10% en peso de cal ($\text{Ca}(\text{OH})_2$ 95%+, Sigma Aldrich). Después se secó una porción de 2 g de la mezcla del caldo + P5HV + cal en un recipiente de aluminio a 150°C usando una balanza de calentamiento infrarrojo (Analizador de Humedad Ohaus MB-45) hasta peso constante. El agua residual remanente fue < 5% en peso. La concentración final de cal en el caldo seco fue de 50 g de cal/kg de sólidos secos o 5% en peso. También se preparó una muestra que contenía solo caldo de fermentación seco + P5HV (sin adición de cal). Las muestras fueron luego analizadas por Py-GC-MS a una temperatura de pirólisis de 300°C.

40 Las Figuras 7 y 8 muestran los cromatogramas de GC-MA para caldo seco + poli-5HV y caldo seco + poli-5HV con 5% de cal añadida respectivamente. En los cromatogramas, los compuestos correspondientes a los principales picos de GC también se enumeran. Los compuestos menores generados a 300°C de las muestras incluían CO_2 , ácido acético, acetaldehído y agua observados al comienzo del cromatograma de GC. Los principales compuestos generados por el calentamiento de las muestras a 300°C fueron valerolactona (marcada como ácido valérico) con un tiempo de retención de 8,7 minutos y una impureza a los 6,3 minutos identificada como alcohol furfurílico. El poli-5HV era la fuente del compuesto de valerolactona y probablemente el azúcar no metabolizado era la fuente del alcohol furfurílico. Se demostró que la adición del catalizador de cal a la biomasa + poli-5HV inhibe la generación de alcohol furfurílico y también un grupo de picos no identificados a los 14-18 minutos. La generación de alcohol furfurílico también se mostró que era dependiente de la temperatura utilizada para la pirólisis reactiva. Por ejemplo, cuando el calentamiento se llevó a cabo a 250°C, la generación de alcohol furfurílico a partir de caldo seco + poli-5HV fue mucho menor que a 300°C.

Ejemplo 7: Generación de ácido acrílico de base biológica a partir de la pirólisis de poli-3-hidroxipropionato derivado de plantas (ejemplo de referencia).

En este ejemplo, se muestra la factibilidad de generar ácido acrílico por pirólisis de una fuente de biomasa vegetal de poli-3-hidroxipropionato (poli-3-HP).

55 Se preparó poli-3HP por fermentación usando una cepa de *E. coli* genéticamente modificada diseñada específicamente para la producción de poli-3HP a partir de jarabe de glucosa como fuente de alimentación de carbono. Los ejemplos de

las cepas de *E. coli*, las condiciones de fermentación, los medios y las condiciones de alimentación se describen en las patentes de los Estados Unidos Nos. 6.316.262; 6,323,010; 6.689.589; 7.081.357; 7,202,064 y 7,229,804. El poli-3HP se extrajo con disolvente de la biomasa microbiana usando metilpropilcetona calentada a 75°C. A continuación, se añadió heptano frío a la solución para precipitar poli-3HP. El precipitado se filtró luego, se lavó con metanol y se secó al vacío durante la noche. El pasto varilla de tipo silvestre, como se describe en la publicación de patente de Estados Unidos No. US 2009/0271889 A1, se cultivó en condiciones de invernadero y las hojas viejas se recogieron después de volverse marrones y se secaron en la planta. Las hojas se mezclaron luego con soluciones acuosas al 10% en peso que contenían carbonato de sodio (Na₂CO₃, 99,5%+, Sigma Aldrich) o sulfato ferroso hidratado (FeSO₄ 7H₂O, JT Baker, 222 Red School Lane, Phillipsburg, NJ 08865). Diversos catalizadores disponibles para la conversión de 3HP en ácido acrílico se describen en la patente de los Estados Unidos No. 2.361.036. Después de mezclar, se secaron luego las mezclas de pasto varilla + catalizador a 110°C y se molieron congeladas utilizando un molino congelador Spex Sample Prep 6870. El tamaño final de partícula fue < 0,5 mm.

Las muestras secas de pasto varilla + catalizador + poly-3HP se analizaron mediante Py-GC-MS con el fin de identificar los compuestos producidos durante la pirólisis de poli-3HP en presencia de biomasa vegetal a 300°C. Para preparar las muestras de pirólisis, se disolvió primero el poli-3HP en cloroformo al 5% en peso y se añadió gota a gota a un recipiente de automuestreo de acero para pirólisis. La mezcla seca de pasto varilla + catalizador se añadió entonces a la copa y el cloroformo se evaporó al vacío. El porcentaje en peso de poli-3HP en la mezcla de biomasa seca se seleccionó al 20% mientras que el catalizador se seleccionó al 5% en peso de biomasa seca. También se prepararon y analizaron con fines comparativos recipientes de muestra de pirólisis que contenían solo pasto varilla y poli-3HP al 20% en peso.

La Figura 9 muestra el cromatograma de Py-GC-MS para pasto varilla + poly-3HP sin catalizador presente. Los principales picos de interés generados a partir del poli-3HP fueron ácido acrílico a 3,7 minutos y dímero de ácido acrílico a 9,3 minutos. Las Figuras 10 y 11 muestran el cromatograma de Py-GC-MS para pasto varilla + poly-3HP con los catalizadores de Na₂CO₃ y FeSO₄, respectivamente. La producción de dímero de ácido acrílico durante la pirólisis de poli-3HP no fue inesperada ya que el ácido acrílico es muy reactivo a altas temperaturas incluso en presencia de inhibidores de la polimerización. Sin embargo, se encontró que la generación del dímero de ácido acrílico se minimizaba más eficazmente en presencia del catalizador de sulfato de hierro hidratado en comparación con el catalizador de carbonato de sodio. También se encontraron temperaturas de pirólisis más altas para minimizar la generación de dímeros de ácido acrílico.

Ejemplo 8: Generación de glicólido a partir de la pirólisis de un microbio genéticamente modificado que produce ácido poliglicólico (ejemplo de referencia).

Se espera que la adición de sales metálicas en exceso a caldos de fermentación que contienen el biopolímero de PHA ácido poliglicólico (PGA) tenga el mismo efecto durante la pirólisis a 300°C como se demuestra para poli-5HV en el Ejemplo 6. Cuando se somete el PGA a pirólisis desde aproximadamente 200°C hasta aproximadamente 350°C descomprimará el PGA en el extremo de la cadena ω-OH del polímero para formar componentes monoméricos o diméricos glicólicos.

Las realizaciones, descritas aquí ilustrativamente, se pueden poner en práctica adecuadamente en ausencia de cualquier elemento o elementos, limitación o limitaciones, no divulgados específicamente en el presente documento. Por lo tanto, por ejemplo, los términos "que comprende", "que incluye", "que contiene", etc. se leerán de forma amplia y sin limitación. Además, los términos y expresiones empleados en este documento se han usado como términos de descripción y no de limitación, y no hay intención en el uso de tales términos y expresiones de excluir cualquier equivalente de las características mostradas y descritas o partes de las mismas, pero se reconoce que varias modificaciones son posibles dentro del alcance de la tecnología reivindicada. Además, se entenderá que la frase "que consiste esencialmente en" incluye aquellos elementos específicamente citados y aquellos elementos adicionales que no afectan materialmente a las características básicas y novedosas de la tecnología reivindicada. La frase "que consiste en" excluye cualquier elemento no especificado.

La presente divulgación debe limitarse únicamente por los términos de las reivindicaciones adjuntas. Debe entenderse que esta descripción no está limitada a métodos, reactivos, composiciones, compuestos o sistemas biológicos particulares, que pueden, por supuesto, variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en este documento tiene el propósito de describir realizaciones particulares solamente, y no pretende ser limitante.

Además, cuando las características o aspectos de la divulgación se describen en términos de grupos Markush, los expertos en la técnica reconocerán que la divulgación también se describe en términos de cualquier elemento individual o subgrupo de elementos del grupo Markush.

Aunque esta invención se ha mostrado y descrito particularmente con referencias a ejemplos de realizaciones de la misma, los expertos en la técnica entenderán que pueden realizarse diversos cambios en la forma y los detalles sin apartarse del alcance de la invención abarcada por las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir un acrilato de alquilo inferior y 2-buteno a partir de una biomasa de poli-3-hidroxitirato genéticamente modificada, que comprende calentar la biomasa en presencia de un catalizador para liberar un componente monomérico del poli-3-hidroxitirato,
- 5 en el que:
- el rendimiento del componente monomérico está entre 40% y 95% con base en un gramo de componente monomérico por gramo de poli-3-hidroxitirato;
- el componente monomérico es ácido crotonico; y
- el procedimiento comprende además las etapas de
- 10 hacer reaccionar el ácido crotonico para formar un éster de crotonato de alquilo inferior, y
- hacer reaccionar el éster de crotonato de alquilo inferior en condiciones adecuadas para formar un acrilato de alquilo inferior y 2-buteno mediante metátesis cruzada en presencia de un primer catalizador con una cantidad suficiente de propileno,
- y en donde el alquilo inferior es un alquilo C2-C4.
- 15 2. El método de la reivindicación 1, en el que el propileno se forma a partir de una reacción de metátesis de etileno y 2-buteno en presencia de un segundo catalizador y el exceso de propileno se elimina continuamente.
3. El método de la reivindicación 1, en el que el primer catalizador no está expuesto a etileno.
4. El método de la reivindicación 1, en el que el primer catalizador es un catalizador de metátesis cruzada de Hoveyda-Grubb.
- 20 5. El método de la reivindicación 1, en el que el primer catalizador es un catalizador de metátesis cruzada de Hoveyda-Grubb que es 1,3-bis(2,4,6-trimetilfenil)-2-imidazolidinilidenedicloro(o-isopropoxifenilmetileno)rutenio.
6. El método de la reivindicación 1, en el que el alquilo inferior es butilo.
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la biomasa se seca antes del calentamiento.
8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que la biomasa procede de un huésped recombinante seleccionado de un cultivo de plantas, bacterias, levaduras, hongos, algas, cianobacterias o una mezcla de dos o más de los mismos.
- 25 9. El método de la reivindicación 8, en el que el huésped es una bacteria.
10. El método de la reivindicación 9, en el que la bacteria se selecciona de *Escherichia coli*, *Alcaligenes eutrophus* (rebautizada como *Ralstonia eutropha*), *Bacillus* spp., *Alcaligenes latus*, *Azotobacter*, *Aeromonas*, *Comamonas*, *Pseudomonas*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Klebsiella*, *Synechococcus* sp PCC7002., *Synechococcus* sp. PCC 7942, *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Thermosynechococcus elongatus* BP-I, *Chlorobium tepidum*, *Chloroflexus auranticus*, *Chromatium tepidum*, *Chromatium vinosum*, *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodobacter capsulatus* y *Rhodopseudomonas palustris*.
- 30 11. El método de la reivindicación 8, en el que el huésped es un cultivo de plantas.
12. El método de la reivindicación 11, en el que el cultivo de plantas se selecciona de tabaco, caña de azúcar, maíz, pasto varilla, sorgo miscanthus, sorgo dulce, camelina o una mezcla de cualquiera de dos o más de los mismos.
13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en el que el calentamiento es a una temperatura de 200°C a 350°C.
- 40 14. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en el que el calentamiento es pirólisis, torrefacción o pirólisis instantánea.

Esquema 1: Recuperación de PHA de biomasa con residuos convertidos en combustible sólido

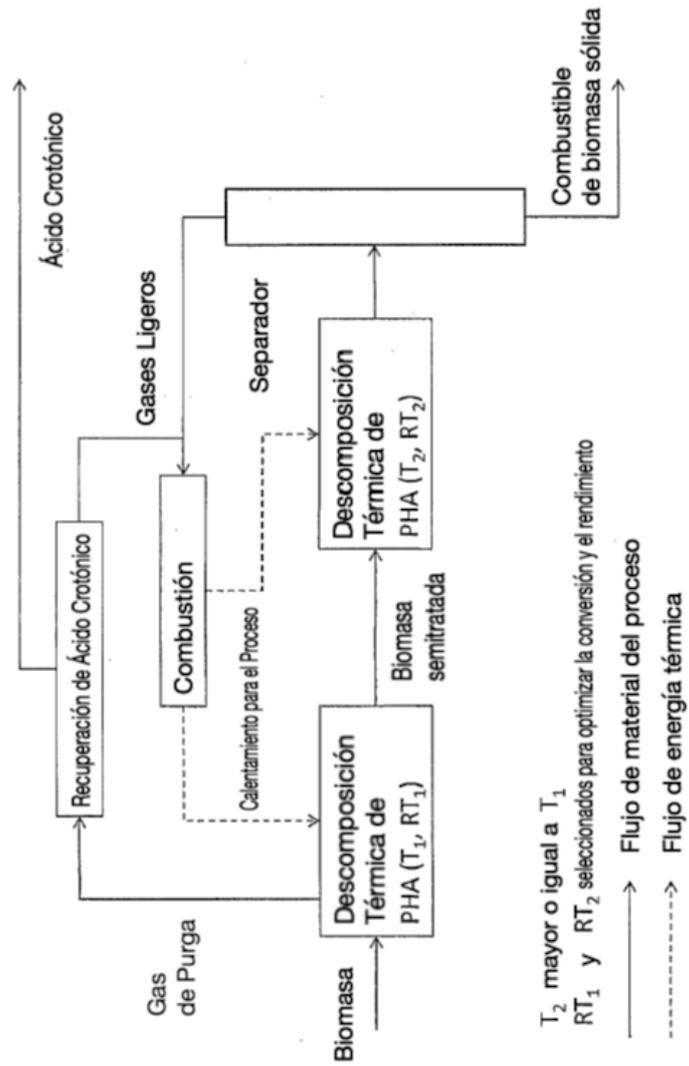


FIG. 1

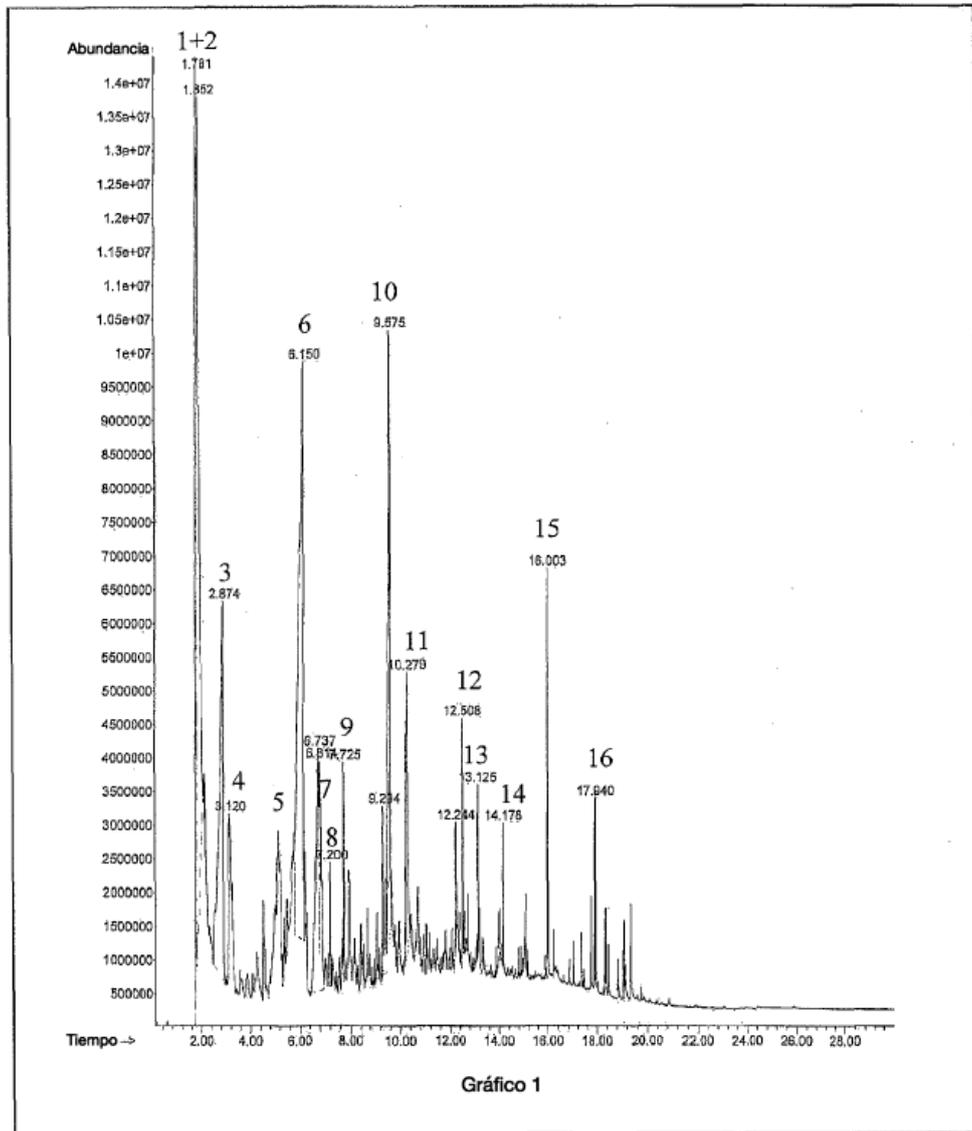


Gráfico 1

FIG. 2

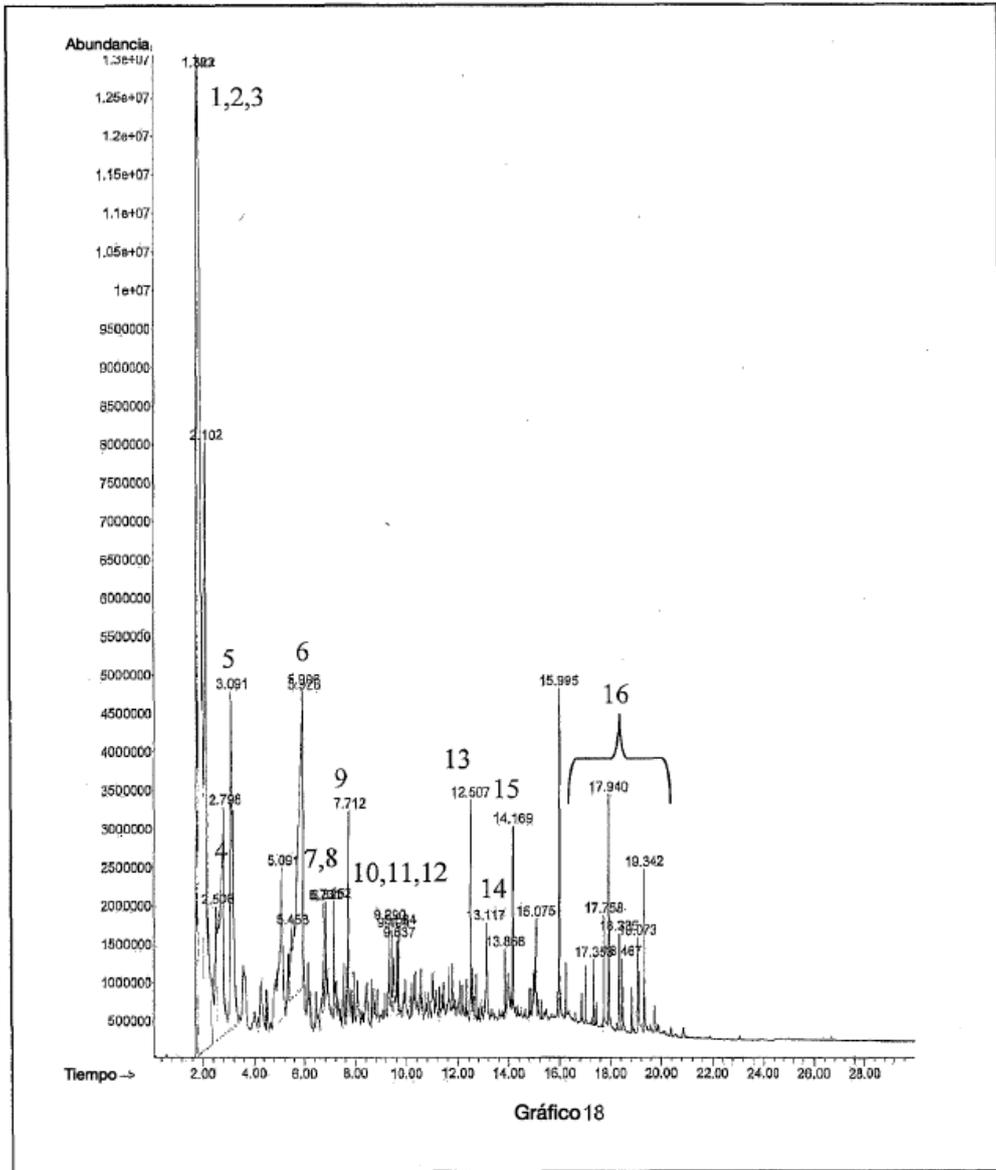
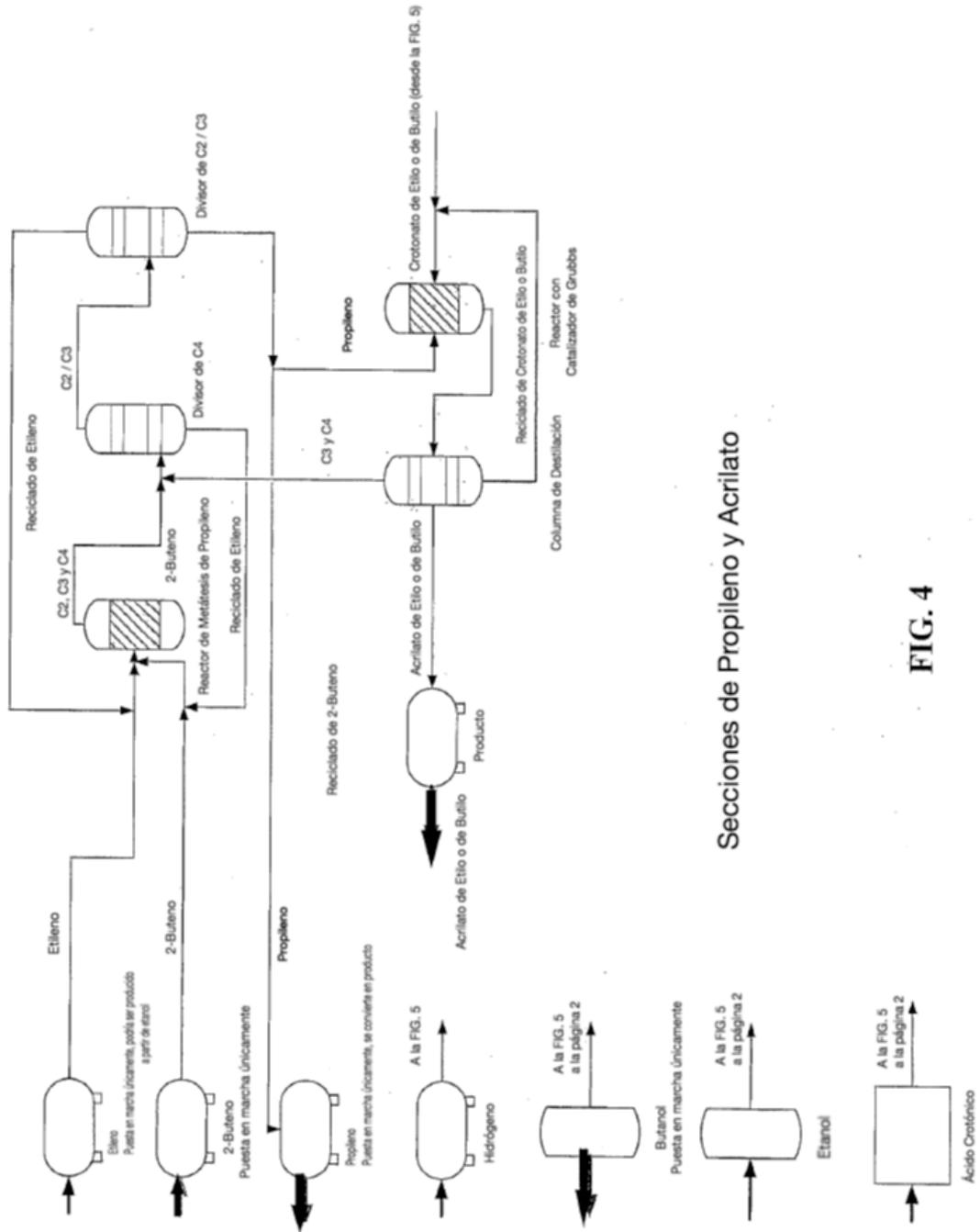


FIG. 3



Secciones de Propileno y Acriiato

FIG. 4

Conversión de Ácido Crotonico en Anhídrido Maleico (MAN)

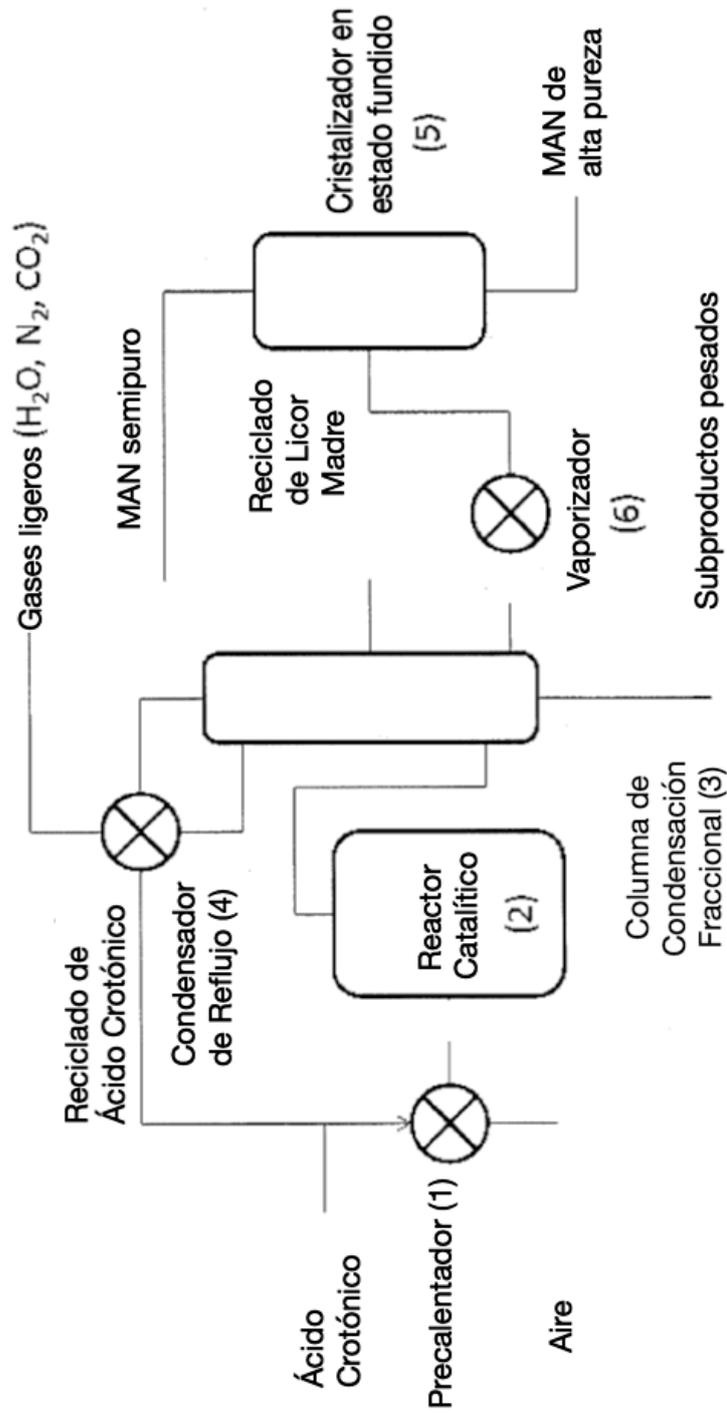


FIG. 6

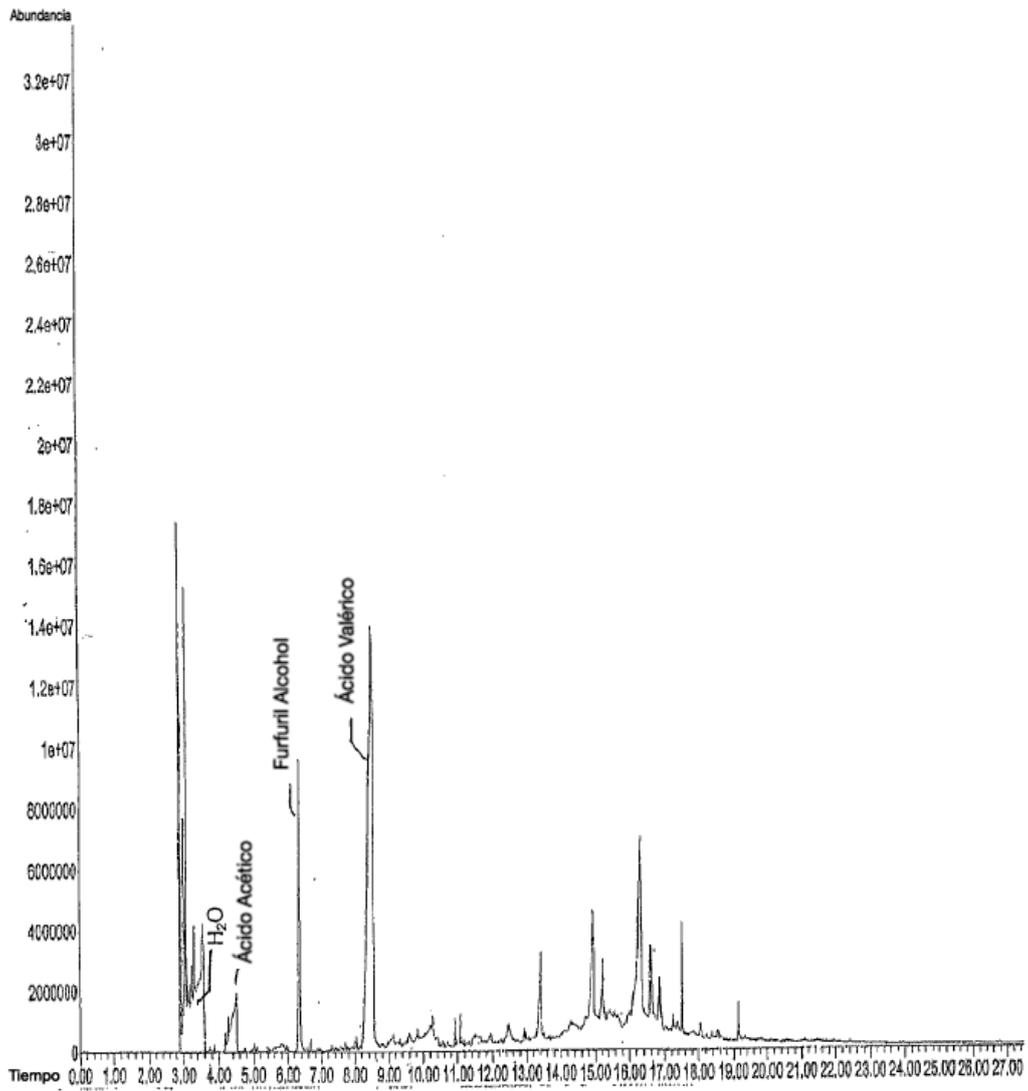


FIG. 7

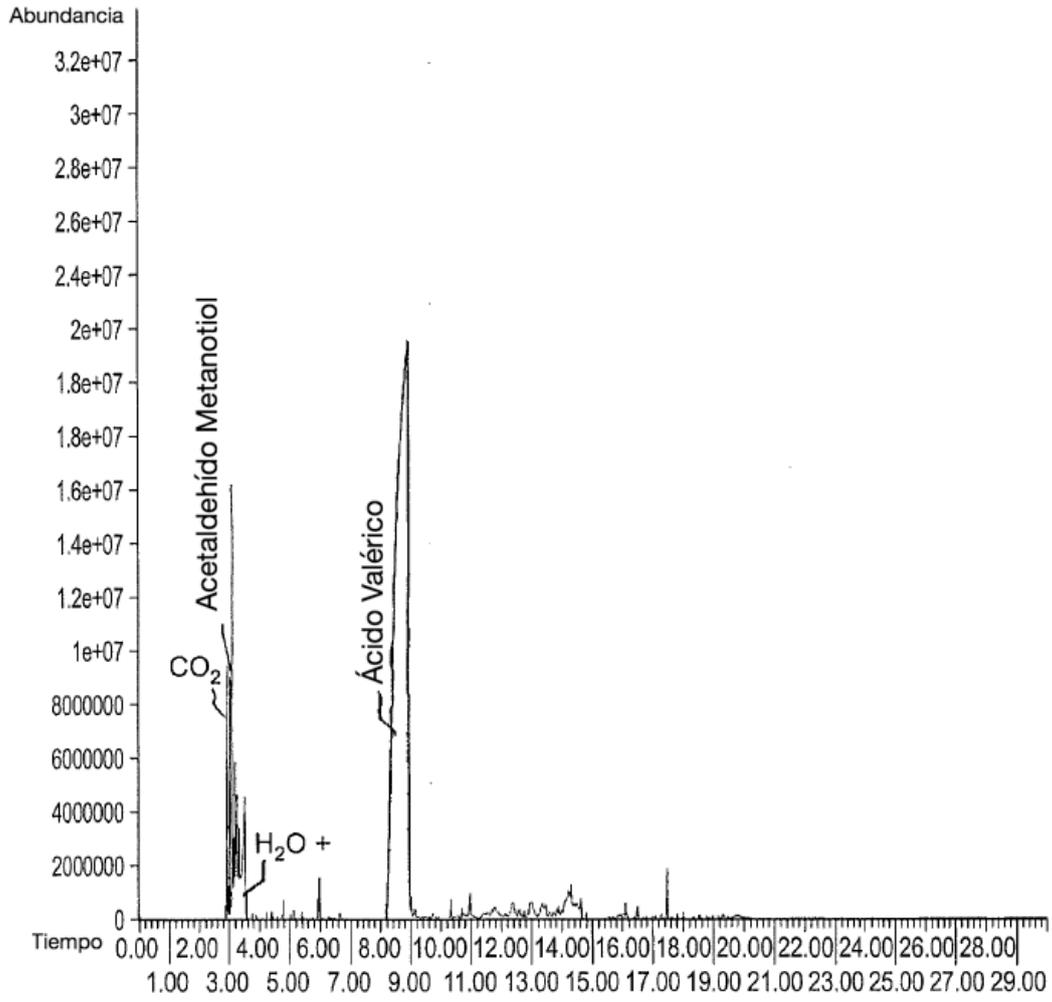


FIG. 8

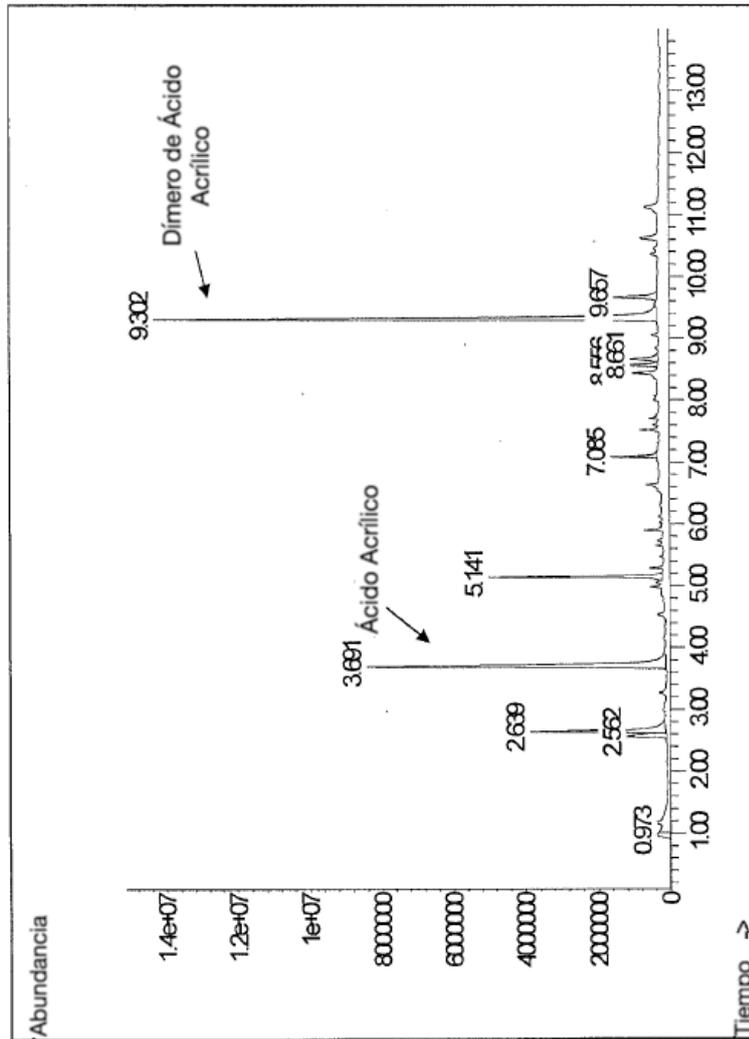


FIG. 9

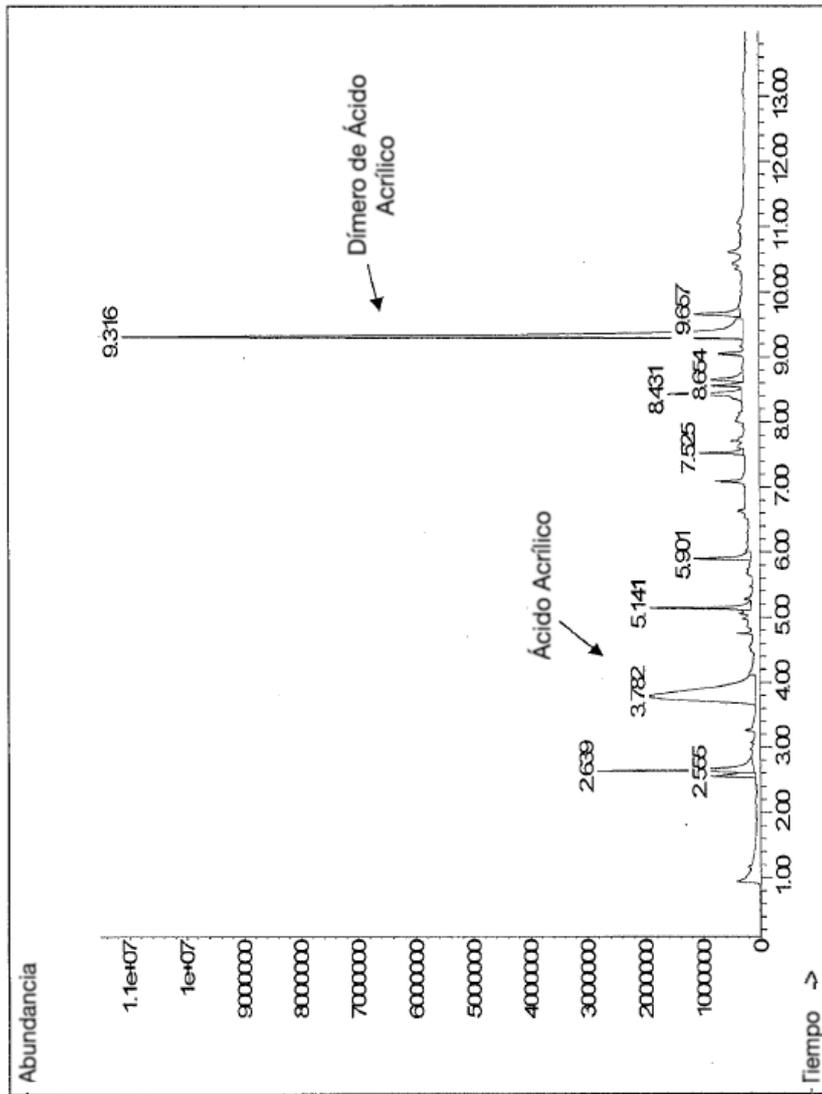


FIG. 10

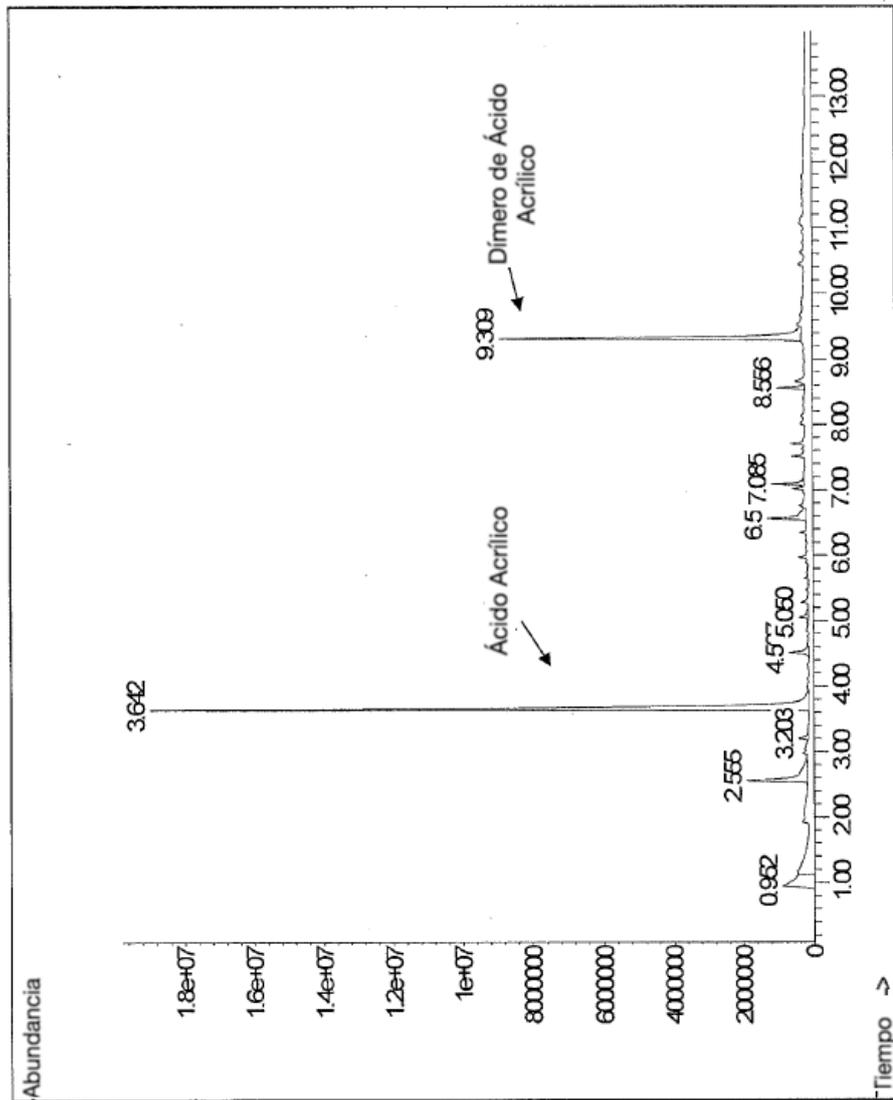


FIG. 11

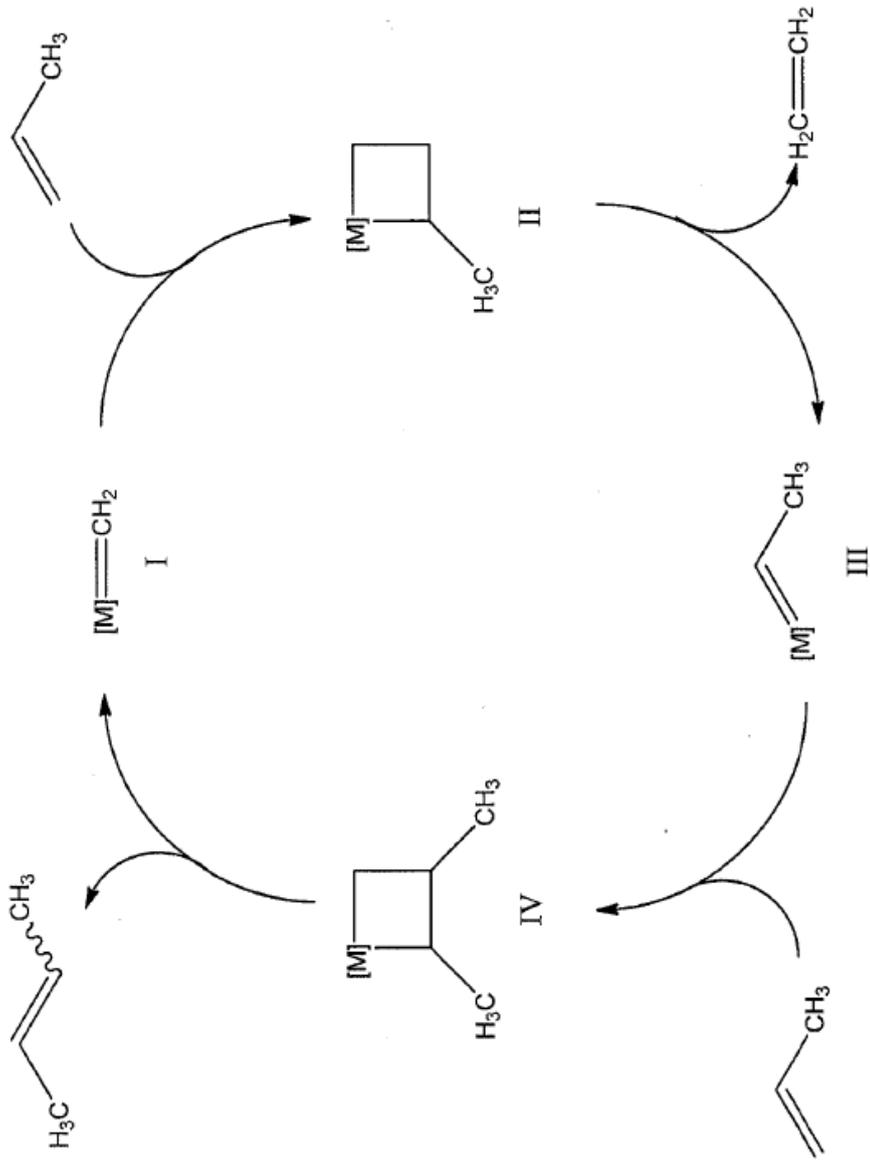


FIG. 12