

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 696 519**

51 Int. Cl.:

**C08G 63/89** (2006.01)

**C08G 63/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.08.2010 PCT/IB2010/002067**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **23.02.2012 WO12022998**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.08.2010 E 10752393 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.10.2018 EP 2606080**

54 Título: **Método de recuperación de polihidroxicanoatos estabilizados a partir de biomasa que se ha utilizado para tratar residuos orgánicos**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**16.01.2019**

73 Titular/es:

**STOWA (100.0%)  
Stichting Toegepast Onderzoek Waterbeheer,  
Stationsplein 89  
3818 LE Amersfoort, NL**

72 Inventor/es:

**WERKER, ALAN, GIDEON;  
JOHANSSON, PETER, STIG, TOMAS;  
MAGNUSSON, PER, OLOF, GÖSTA;  
MAURER, FRANCISCUS, HUBERTUS, JACOBUS  
y  
JANNASCH, PATRIC**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 696 519 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

Método de recuperación de polihidroxicanoatos estabilizados a partir de biomasa que se ha utilizado para tratar residuos orgánicos

**Campo técnico**

- 5 La presente invención se refiere a un procedimiento para producir y recuperar polihidroxicanoatos (PHA) a partir de biomasa, y más particularmente a un procedimiento para estabilizar química y térmicamente los PHA en el procedimiento de recuperación.

**Antecedentes de la invención**

10 La biomasa producida como parte de los servicios de tratamiento de las aguas residuales industriales y/o municipales puede enriquecerse deliberadamente con bacterias acumuladoras de PHA (BAP). La biomasa rica en BAP muestra un potencial significativo de acumulación de PHA al alimentarla con corrientes orgánicas de residuos que contienen demanda química de oxígeno fácilmente biodegradable (DQOFB). La DQOFB típicamente comprende, aunque sin limitarse a ellos, ácidos grasos volátiles (AGV).

15 Chua A.S.M. et al., "Production of polyhydroxyalkanoates (PHA) by activated sludge treating municipal wastewater: effect of pH, sludge retention time (SRT), and acetate concentration in influent" (Water Res., 2003, 37, 3602-3611) describieron una investigación sobre la producción de polihidroxicanoatos (PHA) plásticos biodegradables mediante el tratamiento de aguas residuales municipales con lodos activados. Se estudiaron tres factores operativos: la concentración de acetato, el pH y el tiempo de retención de los lodos (TRL). Los lodos acondicionados con aguas residuales municipales complementadas con acetato pudieron acumular PHA hasta alcanzar 30% del peso seco de los lodos, mientras que los lodos acondicionados con sólo aguas residuales municipales alcanzaron 20% del peso seco de los lodos.

20 Kopinke F.-D. et al., "Thermal decomposition of biodegradable polyesters - I: Poly( $\beta$  - hydroxybutyric acid)" (Polym. Degrad. Stab. 1996, 52, 25-38,) describieron la descomposición térmica de poli(ácido  $\beta$ -hidroxibutírico) biodegradable (PHB). La ruta de reacción dominante es una eliminación en cis estereoselectiva que da lugar a la formación de ácido trans-crotónico y sus oligómeros. La estabilidad térmica del PHB se reduce por la presencia de biomasa bruta del procedimiento de fermentación.

25 El documento US 2006/057692 A1 describe un procedimiento para la extracción de polihidroxicanoatos a partir de biomasa. Comprende la mezcla de la biomasa con un disolvente orgánico durante 1 segundo a 15 minutos a una primera temperatura de entre 5°C, inferior al punto de fusión del polihidroxicanoato, y 10°C, superior al punto de fusión del polihidroxicanoato, y a una presión de 0,1 a 1 MPa (1 a 10 bar), proporcionar una composición que comprende el disolvente orgánico.

30 Al alimentar DQOFB a BAP, puede conseguirse la acumulación de PHA en la biomasa hasta niveles significativos del peso seco final de la biomasa. La biomasa rica en BAP se mezcla con unas aguas residuales ricas en DQOFB bajo condiciones aeróbicas o anóxicas de manera que se maximice el rendimiento de PHA. Típicamente, el peso seco final de biomasa supera ampliamente el 40% de PHA, en donde un kilogramo de peso seco de biomasa activa puede conseguirse que acumule más de dos tercios de kilogramo de peso seco de PHA. Este contenido de PHA se distribuye en la BAP en la biomasa en forma de pequeños gránulos intracelulares incluidos en el citoplasma y estos gránulos pueden tener un diámetro de hasta aproximadamente 0,5  $\mu$ m. Las inclusiones se encuentran circundadas por su propia membrana fosfolipídica, que contiene proteínas para la síntesis de las inclusiones. Los PHA pueden recuperarse de la biomasa en forma de un polímero con una pureza superior a 95% e incluso hasta 99%. El polímero recuperado se denominará resina de PHA recuperada. El objetivo del desarrollo de la presente invención descrita es:

1. establecer un procedimiento viable para la recuperación de resina de PHA a partir de la biomasa,
2. maximizar el rendimiento de masa de PHA recuperado a partir de la biomasa en el procedimiento,
3. minimizar el potencial de reducción incontrolada del peso molecular del PHA durante la extracción con disolvente, y
4. facilitar medios para extraer una resina de PHA que muestra una estabilidad térmica elevada.

35 El PHA producido por dicha biomasa es típicamente, aunque no exclusivamente, poli(ácido 3-hidroxibutírico) y/o un copolímero de los ácidos 3-hidroxibutírico y 3-hidroxivalérico. El PHA que puede recuperarse de esta biomasa es un poliéster biodegradable o biopolímero que muestra propiedades físicas similares a las de plásticos como el polipropileno (PP) y el polietileno (PE). Los PHA pueden mezclarse en plásticos o convertirse adicionalmente en productos químicos plataforma centrales. Sin embargo, al contrario que el PP y el PE, el PHA es completamente biodegradable. La invención representa un subcomponente del concepto global de biorrefinería para un procedimiento de tratamiento de aguas residuales que puede comprender, aunque sin limitación, los elementos siguientes (figura 1):

- I. Un procedimiento unitario diseñado para convertir parte o todo el material orgánico en el afluente a un agua residual rica en DQOFB y para eliminar la totalidad del DQOFB del agua residual, produciendo simultáneamente

una biomasa con potencial actual de acumulación significativa de PHA.

II. Medios para la retención controlada y exportación medida de la biomasa producida con fines de operación estable del procedimiento de tratamiento de aguas residuales y producción de PHA.

5 III. Un procedimiento unitario para acumular PHA hasta niveles significativos en la biomasa producida mediante la utilización de una alimentación rica en DQOFB derivada de las mismas aguas residuales u otras fuentes de residuos orgánicos *in situ* o externas.

10 IV. Un procedimiento unitario para hacer que el PHA-en-biomasa sea térmicamente estable y resistente a la descomposición debida a temperaturas elevadas o interacciones químicas, garantizando simultáneamente un beneficio paralelo en, por ejemplo, la producción de energía a partir de cualquier material no PHA extraído de esta biomasa.

V. Un procedimiento unitario para extraer una resina de PHA con estabilidad térmica.

15 La presente invención se centra en la etapa IV, es decir, en la preparación de PHA en la biomasa para la recuperación y, como etapa necesaria para la purificación eventual (V) a partir de esta biomasa rica en PHA después de la acumulación. La invención proporciona soluciones prácticas para satisfacer los objetivos de calidad del producto en la recuperación del PHA y para satisfacer objetivos paralelos de tratamiento de las aguas residuales y de rendimiento de la manipulación de desechos residuales y de ahorros, tal como se explica en mayor detalle posteriormente.

20 La recuperación de PHA a partir de la biomasa rica en PHA es el problema de separación de los gránulos del otro material celular no PHA (MCNP) que contienen fracciones tanto orgánicas como inorgánicas. La calidad de la resina de PHA recuperada de la biomasa para la utilización como ingrediente en la formación de plásticos puede evaluarse en términos de su: (1) pureza, (2) peso molecular medio y distribución del mismo, (3) estabilidad térmica, (4) estabilidad química, y (5) microestructura y composición de copolímeros. La pureza se refiere al MCNP de la biomasa restante y quizá también a otros compuestos químicos o elementos introducidos o arrastrados durante el procedimiento de purificación.

25 El peso molecular medio refleja el tamaño medio de las longitudes de cadena de polímero. En la mayoría de casos, el PHA es un polímero con una distribución de pesos moleculares relativamente amplia.  $M_n$  es la masa molar media en número y se define como:

$$M_n = \frac{\sum N_i M_i}{\sum N_i}$$

en donde  $N_i$  es el número de moléculas con masa molar  $M_i$ . La masa molar media en peso,  $M_w$ , se define como:

$$M_w = \frac{\sum N_i M_i^2}{\sum N_i M_i}$$

30 El índice de polidispersidad (PDI, por sus siglas en inglés), una medida de la distribución de pesos moleculares, se define como:

$$PDI = \frac{M_w}{M_n}$$

35  $M_w$  siempre es mayor que  $M_n$ , de manera que el PDI siempre será superior a 1. El PDI de la resina de PHA típicamente es de aproximadamente 2 y  $M_w$  puede estar comprendido entre 10.000 y 3.000.000 Da. La distribución de pesos moleculares puede verse influida por el método de acumulación de PHA en la biomasa, por el método de recuperación de la resina de PHA y por el método de procesamiento adicional de la resina en los productos de usuario final.

40 La estabilidad térmica se refiere a la resistencia del polímero a la descomposición como función de la temperatura y el tiempo en una atmósfera especificada. La atmósfera puede ser inerte (tal como nitrógeno) o reactiva (tal como aire u oxígeno). La estabilidad térmica puede evaluarse en términos de una temperatura de descomposición característica de volatilización o pérdida de peso de la muestra. En la práctica, la estabilidad del polímero a su temperatura de procesamiento o a una temperatura ligeramente superior también resulta relevante. De esta manera, la estabilidad térmica también se evalúa mediante la cinética de degradación durante el procesamiento, es decir, la reducción del peso molecular y/o la reducción de la viscosidad dinámica, en aire o en una atmósfera inerte, tal como gas nitrógeno, y a temperaturas de procesamiento relevantes. La estabilidad química en este contexto se refiere a la tendencia a la degradación del polímero en contacto con líquidos (disolventes, no disolventes, acuosos, no acuosos o mezclas de los mismos). Las reacciones químicas pueden iniciarse debido a la temperatura en el transporte y la difusión de compuestos o grupos reactivos que serán más móviles con el polímero en contacto con líquido. Los productos de reacción química en el medio líquido pueden fomentar adicionalmente el proceso de degradación.

Pueden prepararse cultivos mixtos para producir homopolímeros y copolímeros de PHA y el tipo y distribución de los monómeros en el copolímero influye sobre las características de procesamiento y las propiedades del material final. Por ejemplo, la alimentación de la biomasa con ácido butírico o acético representa DQOFB para la acumulación de poli(ácido 3-hidroxibutírico) (PHB). La alimentación de la biomasa con una mezcla de DQOFB de ácidos acético y propiónico puede fomentar la producción de copolímeros de los ácidos 3-hidroxibutírico y 3-hidroxivalérico (PHBV).

Las impurezas en la resina de PHA pueden ser orgánicas y/o inorgánicas. Aunque resulta deseable una pureza elevada, algunas impurezas pueden ser aceptables debido al hecho de que diferentes impurezas muestran diferentes efectos sobre las propiedades o procesabilidad del polímero. En general los presentes inventores han intentado una recuperación del PHA a pureza absoluta, superior a 95% e idealmente superior a 99%. Las impurezas típicamente se relacionan con componentes orgánicos e inorgánicos presentes en los MCNP de la biomasa. Las impurezas orgánicas pueden incluir residuos de proteínas, carbohidratos y lípidos de la biomasa. Las impurezas inorgánicas pueden incluir cationes, tales como calcio, magnesio, sodio y aniones correspondientes, tales como fosfato, sulfato y cloruro. La impureza del PHA también puede deberse a la retención de humedad, que es un reflejo de la presencia de impurezas orgánicas o inorgánicas no deseables. Las impurezas orgánicas pueden producir coloración no deseada y malos olores en el procesamiento de la resina de PHA para formar plásticos y productos. Las impurezas orgánicas también están implicadas en la estabilidad química del polímero. Las impurezas inorgánicas pueden reducir gravemente la estabilidad térmica de la resina. El PHA en la biomasa rica en PHA seca después de un procedimiento de acumulación típicamente puede encontrarse comprendida entre 40% y 60% de la masa seca.

Las estabilidades químicas y térmicas de PHA en biomasa en cultivo puro y mixto después de la acumulación típicamente son bajas y no pueden utilizarse temperaturas superiores a 100°C en el procesamiento de la biomasa o en la recuperación de PHA si se desea evitar la pérdida excesiva de peso molecular.

Dado que hasta 60 por ciento de la biomasa rica en PHA seca puede ser MCNP, podría resultar necesario resolver concurrentemente el destino de esta fracción que no es PHA junto con una recuperación eficiente del PHA. La eliminación final del exceso de biomasa creado por el tratamiento biológico de las aguas residuales se ha convertido en un problema global. Se han dedicado esfuerzos significativos de investigación y desarrollo a desarrollar la tecnología que maximiza la recuperación de energía y recursos a partir de la biomasa de residuos y que minimiza el material que exige una eliminación segura.

El destino de MCNP es una limitación a la recuperación de PHA dentro del contexto del exceso de biomasa utilizado para tratar las aguas residuales. Los residuos de MCNP podrían ser compatibles e idealmente mejorar adicionalmente el estado de la técnica referido a la protección medioambiental en el aspecto de la manipulación de sólidos en las instalaciones de tratamiento de aguas residuales. Se han realizado grandes inversiones de tecnología y desarrollo para corregir las deficiencias y problemas creados por las actuales soluciones de procedimiento para la manipulación de lodos en las plantas de tratamiento de aguas residuales. Idealmente, el enfoque para la recuperación de PHA no sólo debería generar potencial en la producción de biopolímero de valor añadido, sino también una oportunidad de control mayor y más eficaz en la gestión global de los residuos sólidos.

En la conversión del PHA de biopolímero en plástico a partir de una resina purificada, pueden combinarse aditivos. Estos componentes se combinan a la temperatura de procesamiento de la resina o a una temperatura ligeramente superior y la mezcla se extruye y se forman pellets plásticos a partir de la misma. En un ciclo de fusión, puede reducirse la cantidad final de PHA en el material debido a la mezcla de aditivos con el fundido. Habitualmente se pretende mezclar el PHA en los pellets plásticos y estos pellets seguidamente se convierten en una materia prima alimentada a la producción de productos de usuario final que nuevamente requieren calentamiento y formación del plástico. De esta manera, la resina de PHA generalmente sobrevive por lo menos dos ciclos de calentamiento antes de convertirse en un producto de usuario final. Por cada ciclo de calentamiento, el PHA en el plástico reducirá su peso molecular medio. Las propiedades del material plástico se ven directa e indirectamente influidas por el peso molecular de la resina. Por ejemplo, la viscosidad del fundido se reduce con el peso molecular y la procesabilidad del plástico es sensible a la viscosidad del fundido. Una viscosidad excesivamente alta o excesivamente baja puede resultar igualmente no deseable. Sin perjuicio de lo anterior, se prefiere un comportamiento predecible del polímero en el fundido, por lo que un polímero de estabilidades térmica y química consistentes resultan de beneficio general. Las propiedades mecánicas dependen del peso molecular final del polímero procesado y la reducción del peso molecular puede implicar una influencia negativa sobre las propiedades mecánicas del producto.

El nivel de reducción del peso molecular medio depende de factores entre los que se incluyen las estabilidades térmica y química de PHA, el tiempo en el fundido, las temperaturas, las velocidades del husillo y las fuerzas de cizalla aplicadas para el procesamiento. La degradación del polímero en el fundido también se ve fuertemente influida por impurezas o aditivos químicos que pueden incrementar o reducir la estabilidad del polímero a una temperatura de procesamiento dada. La fracción no PHA en el material final puede comprender las impurezas originales presentes en la resina extraída. La fracción que no es PHA también consistirá en los compuestos orgánicos e inorgánicos añadidos.

Los objetivos de los compuestos añadidos pueden resumirse del modo siguiente: 1. los agentes estabilizadores térmicos ayudan a reducir la degradación de polímero no deseada en el fundido que perjudica la procesabilidad de las propiedades del material del producto final. Pueden incluir aditivos tanto inorgánicos como orgánicos e introducir costes en la producción de plástico a partir de PHA. Son ejemplos los óxidos de cinc, estearato de cinc, estearato de

magnesio, estearato de calcio, estearato de bario y los ácidos fosfónicos.

2. Los agentes de nucleación incrementan la aparición y tasa de cristalización del polímero a partir del fundido y la cristalización rápida resulta de importancia práctica para el procesamiento industrial del plástico y la vida útil del producto final. La morfología final del PHA se ve influida, lo que, a su vez, afecta a las propiedades del material. Son ejemplos, nitrato de boro, talco, ácido palmítico, ácido oleico, ácido linoleico, sacarina, cloruro amónico, sales de ácido esteárico y ácidos fosfónicos.

3. Los compuestos plastificadores reducen la transición vítrea del polímero, ablandándolo, reduciendo la fragilidad y, de esta manera, incrementando la resistencia a la elongación y al impacto. Estos aditivos desempeñan un papel para los PHA de longitud de cadena corta, como PHB y PHBV, los cuales son frágiles. Son ejemplos, los citratos de acetiltrialquilo, triacetina, ésteres de ftalato, maleato, sebacato, adipato, oligómeros de PHA, dioles y trioles.

4. Los agentes colorantes que proporcionan una coloración específica al plástico. Los requisitos de color son muy exigentes, por lo que resulta deseable que cualquier tendencia a la coloración de la resina debida al procesamiento sea consistente y pueda compensarse.

5. Los materiales compuestos implican un aditivo que posee un papel funcional de carga y potencia las propiedades mecánicas del material. Por ejemplo, el MCNP de la biomasa puede considerarse que es una carga y el material compuesto resultante se ha utilizado como recipiente biodegradable para plántulas de árbol, donde las demandas de propiedad mecánica no son grandes. También pueden utilizarse fibras naturales como material compuesto con PHA, donde el polímero proporciona la matriz para la red de fibras. Este PHA reforzado con fibras puede mostrar la resistencia del PHA con una resistencia al impacto muy superior a la del PHA por sí solo. También pueden utilizarse cargas para reducir el coste del plástico, al reducir el contenido de PHA con la condición de que las propiedades del material compuesto satisfagan las exigencias de la aplicación.

Se ha observado que los PHA recuperados a partir de la biomasa muestran estabilidades térmica y química bajas. La resina nativa disponible actualmente en el mercado se degrada rápidamente en el fundido. La pérdida de peso molecular durante el procesamiento sólo puede permitirse hasta el punto en que la viscosidad del fundido es excesivamente baja o la calidad del producto final resulta impactada negativamente. Sin embargo, la obtención de tales márgenes de pérdida de peso molecular podría no ser viable en la práctica en los tiempos de procesamiento. La estabilidad térmica de la resina de PHA recuperada puede mejorarse mediante la purificación adicional para eliminar las impurezas implicadas o mediante la adición de agentes estabilizadores. Ello añadirá complejidad y costes. Además, algunos agentes estabilizadores pueden generar la desventaja de un potencial de problemas medioambientales en el ciclo de vida de los productos de plásticos a base de PHA.

Los MCNP de la biomasa pueden eliminarse para enriquecer el contenido de PHA de la biomasa recuperada de un procedimiento de acumulación. Los MCNP pueden eliminarse utilizando estrategias de tratamiento que implican medios mecánicos, químicos, enzimáticos y térmicos o combinaciones de los mismos. Las condiciones óptimas de eliminación de los MCNP implican la duración del tratamiento, la concentración química/enzimática, la entrada de energía y la temperatura. A pesar del potencial de mejora del contenido de PHA de la biomasa hasta un nivel muy superior a 70%, tal tratamiento puede fomentar cierta degradación de los PHA en la biomasa. La lisis de las células y la liberación de gránulos de PHA a la matriz puede complicar adicionalmente la separación de las inclusiones de PHA respecto de otros residuos celulares y reducir el rendimiento de producto. Una solubilización significativa de la biomasa crea un problema en el tratamiento de las aguas residuales aguas abajo debido a la liberación a la solución de carbono orgánico, nitrógeno y fósforo.

Aunque el contenido de PHA pueda enriquecerse, el acondicionamiento de la biomasa crea una desventaja paralela en la gestión de los residuos debido a la liberación concomitante de carbono, nitrógeno y fósforo. Esta desventaja puede convertirse en una ventaja en situaciones en las que el carbono puede utilizarse para producir biogás y los nutrientes pueden reciclarse para el tratamiento biológico de las aguas residuales industriales pobres en nutrientes. Sin embargo, el rendimiento de recuperación de polímero puede reducirse debido a la captura deficiente de sólidos en suspensión tras la ruptura celular, que conduce a mezclas de residuos celulares y gránulos de PHA.

Aunque el contenido de PHA pueda enriquecerse mediante el acondicionamiento de la biomasa, la producción de una resina de PHA puede requerir finalmente en todos los casos alguna forma de extracción con disolvente. Se separa los PHA de los MCNP mediante disolución de los PHA en un disolvente. En el caso de que deban evitarse temperaturas superiores a 100°C debido a la mala estabilidad térmica de los PHA en la biomasa, entonces pueden resultar necesarios disolventes clorados, tales como cloroformo y diclorometano. En el caso de que estos disolventes se utilicen para extraer los PHA, se utiliza un no disolvente, tal como agua o metanol, para precipitar los PHA a partir del disolvente después de la filtración de los MCNP no disueltos. Se generan grandes volúmenes de residuos peligrosos debido a la combinación de un disolvente clorado y el codisolvente utilizado.

En el caso de los PHA, si la biomasa ha sido acondicionada por lo menos en la medida de estabilidades térmicas y químicas mejoradas de los PHA en la matriz, las temperaturas necesarias en el procedimiento de recuperación de PHA pueden estar comprendidas entre 100°C y 160°C con poca pérdida de peso molecular. Dentro de este intervalo de temperaturas, varios disolventes deficientes pueden extraer los PHA a partir de los MCNP. Estos son disolventes

que no disuelven los PHA por debajo de 100°C pero son buenos disolventes para extraer los PHA a más de 100°C. Son ejemplos de tales disolventes, acetona, butanol, propanol, etanol, metanol y carbonato de 1,2-propileno, entre otros. Sin embargo, la estabilidad de los PHA disueltos en estos disolventes también es dependiente del tipo de disolvente y del isómero. Algunos PHA pueden extraerse a temperaturas más bajas, de manera que el disolvente requerido y la temperatura de extracción también son dependientes de PHA. El PHB representa el peor escenario posible de solubilidad y extracción con disolvente. A pesar del potencial de exposición a temperaturas elevadas requerido para la extracción con disolvente de la resina de PHA a partir de biomasa, el secado de la biomasa en general antes de la extracción con disolvente puede llevarse a cabo más eficazmente a temperaturas claramente superiores a 100°C. Por ejemplo, el secador de doble cinta de baja temperatura puede implicar la exposición de la biomasa a temperaturas de entre 140°C y 180°C.

Los MCNP residuales después de la extracción todavía contienen la mayor parte del carbono orgánico, nitrógeno y fósforo de la biomasa original. Este residuo de extracción es higiénico y una materia prima adecuada para tecnologías biológicas y termoquímicas que rinde compuestos químicos plataforma y/o energía. Los MCNP o residuos resultantes de la extracción química/energética también pueden utilizarse directamente en formulaciones de producto destinadas a suministrar nutrientes y minerales para la agricultura. Por lo tanto, el método de recuperación de PHA también puede considerarse un método paralelo de captura de otros residuos de valor añadido, evitando simultáneamente problemas de gestión de residuos que sí existen en el estado de la técnica actual de gestión de lodos.

Los esfuerzos en el desarrollo de una solución de recuperación de PHA a partir de biomasa rica en PHA han tenido los objetivos centrales siguientes:

1. limitar la necesidad de adiciones químicas a fin de reducir la complejidad del procedimiento y los costes asociados al procesamiento de la biomasa residual,
2. permitir el secado de la biomasa a temperatura más alta antes de la extracción de la resina,
3. permitir la extracción con disolvente de la resina a temperatura más alta a partir de la biomasa con disolventes no clorados al garantizar que los PHA en la biomasa son térmica y químicamente estables antes de la extracción con disolvente,
4. facilitar la producción de un PHA de elevada estabilidad térmica con el fin de reducir significativamente la necesidad de agentes estabilizadores en la formulación de plástico, y
5. captura de una fuente de MCNP residuales que pueda gestionarse y explotarse fácilmente para su contenido mineral, orgánico y calorífico.

### Compendio de la invención

La presente invención implica un método según la reivindicación 1. El método incluye solubilizar iones asociados a la biomasa en el licor mixto mediante el tratamiento del mismo mediante reducción del pH del licor mixto a un valor inferior a 6, o mantener el pH del licor mixto en un valor inferior a 6 durante un periodo de tiempo seleccionado. Después, desaguar el licor mixto y separar eficazmente por lo menos algunos de los iones de los PHA en la biomasa, lo que resulta en una estabilidad incrementada de los PHA en la biomasa.

### Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Diagrama de flujo del procedimiento de producción de PHA.

Figura 2. Diagrama de flujo del procedimiento de recuperación de PHA a partir de biomasa.

Figura 3. ATG de biomasa de LO-S seca durante la acumulación de los PHA.

Figura 4. Tasa de pérdida relativa de peso de la biomasa de LO-S seca.

Figura 5. Tasa de pérdida de peso normalizada de los PHA en la biomasa y efecto del acondicionamiento del pH de la biomasa sobre la temperatura de descomposición.

Figura 6. Efecto de la fracción inorgánica de la biomasa y acondicionamiento del pH de la biomasa sobre las temperaturas de descomposición de los PHA en la biomasa durante la acumulación de los PHA de LO-S.

Figura 7. Temperaturas de descomposición de los PHA en la biomasa para ocho réplicas de acumulación de PHA de LO-S con respecto a la acumulación de materia inorgánica concurrente al almacenamiento de los PHA.

Figura 8. Fracción relativa de masa inorgánica previamente a la acumulación de los PHA, al final de la acumulación de los PHA y después de la acidificación (acondicionamiento del pH de la biomasa).

Figura 9. Contenido de calcio de la biomasa correlacionada con las temperaturas de descomposición de los PHA en la biomasa para la biomasa LO-S.

- Figura 10. Contenido de calcio de la biomasa correlacionado con la fracción de descomposición de los PHA en la biomasa a 250°C para la biomasa LO-S.
- Figura 11. PHA en la biomasa y fracciones inorgánicas de la biomasa durante la acumulación de PHA AS-F.
- 5 Figura 12. Temperatura de descomposición de los PHA en la biomasa con respecto a la fracción inorgánica variable de la biomasa para la acumulación de PHA LO-F.
- Figura 13. Efecto de la extracción con disolvente sobre el peso molecular de los PHA a partir del control de AS-F seco y después de la acidificación del licor mixto (LM).
- Figura 14. Efecto de la extracción con disolvente sobre la fracción de masa residual que no es PHA y temperatura de descomposición para el control y después de la acidificación del licor mixto (LM) para PHA en la biomasa AS-F y resina de PHA resultante.
- 10 Figura 15. Tasas normalizadas de descomposición según ATG de los PHA en la biomasa para biomasa liofilizada PC-F y preacondicionada.
- Figura 16. Efecto del preacondicionamiento CP-F sobre la fracción inorgánica de la biomasa y la temperatura de descomposición de los PHA en la biomasa.
- 15 Figura 17. Efecto del preacondicionamiento CP-F sobre la fracción de descomposición de los PHA en la biomasa y temperatura de descomposición de la biomasa CP-F.
- Figura 18. Efecto de la extracción con disolvente sobre el peso molecular relativo de los PHA procedente de biomasa PC-F sin y con enjuague de preacondicionamiento.
- Figura 19. Efecto de la extracción con disolvente y preacondicionamiento sobre la fracción de masa residual que no es PHA y temperatura de descomposición para PHA dentro de biomasa PC-F y para la resina de PHA.
- 20 Figura 20. Estabilidad térmica de la resina de PHA considerando las temperaturas de descomposición  $T_5$  y  $T_d$  con respecto a la descomposición fraccionada de PHA,  $f_d^{250}$ .
- Figura 21. Influencia del enjuague con agua ácida en combinación con la extracción con acetona sobre CP-F con respecto a la tasa de descomposición de la resina de PHA.
- 25 Figura 22: Comparación del contenido de no PHA de resina de PHA producida a partir de cultivo mixto (CM-PHA-AK) utilizando LO-S y grados comerciales de resina de PHA derivada de procedimientos de fermentación de cultivo puro (PC-PHA-1 y -2).
- Figura 23. Contenido estimado de elementos inorgánicos en la resina de PHA de cultivo mixto (CM-PHA-AK) utilizando AS-S y grados comerciales de resina de PHA derivada de procedimientos de fermentación de cultivo puro (PC-PHA-1 y -2).
- 30 Figura 24. Estabilidad térmica de la resina de PHA como función del contenido de calcio.
- Figura 25. Efecto del enjuague y nuevo secado de CP-PHA-1 con agua desionizada y ácida.
- Figura 26. Efecto del enjuague de CP-PHA-1 sobre el contenido no de PHA y la temperatura de descomposición térmica de la resina de PHA.
- 35 Figura 27. Influencia de los iones introducidos sobre la temperatura de descomposición térmica de la resina de PHA.
- Figura 28. Viscosidad de la resina de PHA derivada de LO-S fundida a partir de la reología del polímero.
- Figura 29. Estabilidades del fundido 1-log de la resina de PHA de cultivo mixto derivada de LO-S y grados comerciales de resina de PHA derivado de cultivo puro.
- Figura 30. Diagrama de dispersión de la pureza estimada según ATG y estabilidades del fundido de muestras de resina de PHA procedente de fuentes tanto de cultivo puro como de cultivo mixto.
- 40 Figura 31. Relación entre  $T_5$  y la estabilidad de fundido 1-log para muestras de resina de PHA procedentes de fuentes tanto de cultivo puro como de cultivo mixto.
- Figura 32. Relación entre la pérdida relativa de peso a 250°C y la estabilidad del fundido 1-log para muestras de resina de PHA procedentes de fuentes tanto de cultivo puro como de cultivo mixto.

45 **Descripción de realizaciones preferentes**

Los PHA en biomasa de cultivo puro y de cultivo mixto pueden mostrar una estabilidad térmica reducida. La resina de

PHA disponible comercialmente también es conocido que muestra una estabilidad térmica reducida en ausencia de cualquier agente estabilizador. La estabilidad térmica de los PHA en la biomasa, así como los PHA en forma de una resina pura se entiende que se ven influidos significativamente por la presencia de metales residuales de los grupos I y II, tales como calcio, magnesio y sodio.

5 La inestabilidad térmica de los PHA en la resina puede superarse en cierto grado mediante la adición de agentes estabilizadores, típicamente mientras los PHA se encuentran en un estado fundido. De esta manera, se añaden agentes estabilizadores a expensas de la reducción del peso molecular medio. Además, los agentes estabilizadores podrían no interactuar homogéneamente con la matriz de resina de PHA, lo que, a su vez, afecta a las propiedades del material. De esta manera, cuanto mayor es la estabilidad térmica de fondo de la resina de PHA, mejores serán las propiedades globales de la matriz mezclada.

10 Alternativamente, se ha informado de que la estabilidad térmica de la resina de PHA puede mejorarse mediante la reducción del contenido residual de metales a mayor coste y esfuerzo mediante lavado ácido en un disolvente clorado acidificado. Una estabilidad térmica baja de los PHA como resina purificada puede comprometer la procesabilidad del polímero. Se compense (con agentes estabilizadores) o se mejore (tratamiento con disolvente ácido-clorado) o no la estabilidad térmica de la resina de PHA, estos remedios introducen costes y residuos adicionales, restando atractivo a los PHA como materia prima para la ingeniería 'verde'. Además, el potencial de restricción del tipo de disolvente de extracción adecuado para la purificación de la resina significa que se desea una biomasa rica en PHA en la que puedan aplicarse temperaturas superiores a 100°C para el secado y extracción con disolvente sin pérdida significativa de peso molecular en la resina final y, por lo tanto, las estabilidades térmica y química de los PHA en la biomasa necesita mejorarse antes del secado de la biomasa y la extracción con disolvente de la resina.

15 Una solución para procesar biomasa de cultivo mixto tras la acumulación de PHA implica una secuencia de etapas de procesamiento (figura 2). Puede ocurrir perfectamente que algunas de las etapas de procesamiento se lleven a cabo como parte de actividades diferentes e independientes separadas sustancialmente en el tiempo y/o en el espacio. Aunque pueden requerirse procedimientos unitarios diferentes (reactores) para llevar a cabo algunas de estas etapas de procedimiento, otras etapas en la secuencia pueden integrarse fácilmente y combinarse dentro del mismo procedimiento unitario o reactor. La entrada en el procedimiento es una biomasa nueva después de la acumulación y que contiene más de 40% en peso seco de PHA. Los PHA en esta matriz de biomasa muestran estabilidades química y térmica bajas. La biomasa también se encuentra todavía activa con sistemas enzimáticos con tendencia a despolimerizar los PHA almacenados. La salida del procedimiento V en la figura 1 es la misma biomasa, que contiene menos de 5% en peso de humedad y PHA con una estabilidad química y térmica significativamente mejoradas. Esta biomasa puede extraerse con un disolvente a temperaturas superiores a 100°C sin perjudicar las propiedades de los PHA. Los productos después de la extracción con disolvente son una resina de PHA, MCNP y un disolvente que puede reciclarse.

La secuencia de etapas es la siguiente:

35 1. Deshidratación primaria de la biomasa después de la acumulación:

40 descargar el máximo posible de agua residuales tratadas. Tras la acumulación, típicamente puede esperarse un licor mixto con 2 a 10 g/l de SST en donde los PHA de esos SST es superior a 40% en una base en peso seco. El pH del licor mixto típicamente es superior a 7 aunque inferior a 10. El procedimiento de acumulación proporciona el tratamiento biológico de eliminación del carbono. La manipulación posterior de la biomasa requiere el ajuste del pH, por lo que resulta ventajoso eliminar el máximo de líquido para reducir la capacidad tamponadora. Las condiciones anaeróbicas resultan beneficiosas para minimizar la pérdida de PHA debido al metabolismo aeróbico de la biomasa. La biomasa sedimentada se ha almacenado hasta 12 horas sin ningún impacto significativo sobre el contenido de polímero. Se prevé que esta deshidratación inicial conseguirá un contenido de sólidos secos superior a 1% aunque inferior a 10%. Pueden utilizarse las adiciones químicas para ayudar a la floculación de la biomasa. Debería evitarse el arrastre de aire en la deshidratación, pero si resulta inevitable, debería minimizarse la cantidad y duración del arrastre de aire.

2. Reducción del pH en el licor mixto:

50 Se ajustó el pH del licor mixto a un valor entre 2 y 5 con el fin de inhibir la actividad microbiana, mejorando simultáneamente también la estabilidad térmica y química de los PHA en la biomasa. La mejora de la estabilidad térmica de los PHA en la biomasa puede evaluarse mediante análisis termogravimétrico (ATG) siguiendo un método estandarizado. Resulta preferente una estabilidad térmica mejorada para el secado de la biomasa y la posterior extracción con disolvente, ambas con temperaturas superiores a 100°C. La estabilidad térmica se correlaciona positivamente con el contenido inorgánico de la biomasa y más notablemente con cationes, tales como el calcio.

55 La mejora de la estabilidad química de los PHA puede evaluarse, por ejemplo, a partir de la pérdida de peso molecular tras una extracción estandarizada en acetona a 125°C durante dos horas. Es posible que los PHA en la biomasa sean térmicamente estables sin ser químicamente estables y es posible conseguir estabilidad química con sólo una mejora menor de la estabilidad térmica. Aunque la estabilización térmica o química por sí sola reduce el grado de pérdida del peso molecular con el secado a alta temperatura y la extracción con disolvente, una combinación de estabilidad térmica

y química proporciona el mejor resultado.

La reducción del pH resulta en un efecto secundario de solubilización de la biomasa marginal. Por ejemplo, la acidificación con  $H_2SO_4$  a pH 2 puede esperarse que libere del orden de 100 mg de DQO/g de SST y 5 mg de N/g de SST. La solubilización del DQO y del nitrógeno de la biomasa se relaciona con la liberación de (muy probablemente) proteínas y polisacáridos extracelulares. En general, la liberación de nitrógeno a partir de la biomasa es proporcional a la liberación de carbono. A un pH inferior a 5, la capacidad tamponadora de la matriz líquida se vuelve despreciable. Sin embargo, se ha observado que la biomasa ejerce una capacidad tamponadora significativa y constante a un pH inferior a 5 y superior a 2. A un pH próximo a 2, la capacidad tamponadora de la biomasa se incrementa drásticamente. Los presentes inventores han observado que los objetivos de estabilización térmica y química de los PHA en la biomasa pueden alcanzarse adecuadamente a un pH superior a 2 pero inferior a 5. El pH necesario puede variar de caso a caso según la naturaleza de la matriz de licor mixto y la alimentación de acumulación. Debido a que el ajuste del pH supone un coste operativo, el ajuste del pH no debe ser mayor del necesario. Las mediciones de ATG proporcionan un medio para determinar si se ha alcanzado la estabilización óptima de los PHA en la biomasa.

La reducción del pH del licor mixto puede incluir la liberación de gas dióxido de carbono como carbono inorgánico forzado a ácido carbónico. Dichas burbujas de dióxido de carbono pueden utilizarse para la flotación con gas disuelto y la separación de la biomasa respecto al licor mixto tras el ajuste del pH. Si se utiliza la oxidación o dispersión mecánica de la biomasa con el ajuste ácido del pH, se ha encontrado que se degradan las propiedades de deshidratación de los sólidos en suspensión.

Pueden conseguirse resultados similares de estabilidad química incrementada con cierta mejora de la estabilidad térmica de los PHA en la biomasa mediante oxidación suave. Ejemplos de oxidantes no específicos incluyen hipoclorito, peróxido de hidrógeno y ozono. La oxidación suave de la biomasa con hipoclorito solo puede no mejorar la estabilidad térmica en la misma medida, aunque, sin embargo, aparentemente genera una mejora satisfactoria de la estabilidad de los PHA para la extracción con disolvente caliente. Las mediciones de ATG indican que el tratamiento de hipoclorito incrementa la temperatura, marcando el inicio de la degradación térmica de los PHA en la biomasa. La oxidación suave de la biomasa mejora la estabilidad química de los PHA. Tal oxidación suave puede combinarse con el ajuste del pH con buenos resultados de estabilidad térmica y química para la extracción con disolvente de los PHA a partir de la biomasa. Sin embargo, la oxidación de la biomasa también solubiliza una cantidad significativa del carbono orgánico y nitrógeno en la solución. La ventaja de arrastrar la DQO de la biomasa es un enriquecimiento en contenido de PHA en los sólidos suspendidos. La desventaja de la liberación de DQO y nitrógeno es que ello genera un problema de tratamiento de las aguas residuales. Los oxidantes también pueden degradar los polímeros, además de la biomasa.

### 3. Espesamiento y deshidratación secundarios de la biomasa después de la reducción del pH:

La biomasa se deshidrata adicionalmente por diversos medios, incluyendo la flotación con gas disuelto, por ejemplo. El gas puede deberse en parte a las burbujas de dióxido de carbono formadas por la acidificación. También puede añadirse aire de dispersión para conseguir la separación de la biomasa mediante flotación. Además, pueden añadirse compuestos químicos durante la separación con el fin de mejorar la deshidratabilidad de la biomasa. Tras reducir el pH del licor mixto, se reduce la actividad metabólica de la biomasa y los PHA en la biomasa presenta, de esta manera, una menor tendencia a la degradación metabólica durante la flotación con aire disuelto u otras formas de arrastre con aire. La biomasa preferentemente se deshidrata hasta un nivel superior a 20% de contenido de sólidos secos. La flotación con aire disuelto puede conseguir un nivel superior a 4% de sólidos secos, por lo que se requerirán medios adicionales, tales como la centrifugación. Pueden aplicarse otros métodos de reducción del contenido de agua de la biomasa en lugar de la flotación con aire disuelto y/o la centrifugación.

La solubilización de la DQO también puede incrementarse mediante el tratamiento de la biomasa con oxidantes, enzimas, tensioactivos, dispersión, homogeneización y/o el térmico. El tratamiento químico, térmico o mecánico de la biomasa en esta etapa puede resultar interesante por motivos que incluyen, aunque sin limitarse a ellas, (1) el enriquecimiento en contenido de PHA de la biomasa, (2) el suministro de DQO para la producción de AGV o biogás, (3) el suministro de nitrógeno para el tratamiento biológico de las aguas residuales, o (4) la mejora de la deshidratación de los sólidos en suspensión. Simultáneamente, existe el riesgo de que estos tratamientos pueden resultar excesivamente agresivos y provocar la pérdida de PHA. La introducción de recursos (compuestos químicos y energía) puede estar justificada desde el punto de vista de la gestión tanto de los PHA como de los MCNP. La optimización de las condiciones, incluyendo la dosis, el tiempo y la temperatura, probablemente resultará necesaria de manera individualizada para los sistemas de cultivo mixto.

### 4. Secado de la biomasa o desplazamiento del agua:

Para conseguir condiciones óptimas para la extracción con disolvente a alta temperatura, la biomasa debería secarse o debería desplazar el agua. El contenido de humedad final después del secado preferentemente no debería ser superior al 5%. El acondicionamiento anteriormente indicado para conseguir la estabilidad de los PHA en la biomasa permite la utilización de temperaturas de secado muy superiores a 100°C.

## 5. Extracción con disolvente:

Los PHA pueden extraerse de los MCNP con un disolvente orgánico no clorado a temperaturas superiores a 100°C y, para el PHB, preferentemente superiores a 120°C. Tras la extracción, se separan los PHA de los MCNP antes o después de la precipitación de los PHA. Dependiendo del disolvente de extracción, la precipitación de la resina de PHA puede requerir la adición de un segundo disolvente. El disolvente se separa de los MCNP y PHA. El disolvente puede recuperarse y reutilizarse mediante destilación. Se secan los PHA. Los MCNP y el disolvente con residuos asociados pueden recuperarse y/o utilizarse en parte como combustible para necesidades de calefacción.

Si se ha conseguido un acondicionamiento (estabilización) suficiente de los PHA en la biomasa, la resina de PHA después de la extracción debe haber retenido gran parte de su peso molecular (en comparación con el caso de ningún acondicionamiento de la biomasa) y los PHA deberían ser estables según evaluación mediante ATG o a partir de la tasa de pérdida de peso molecular según las mediciones de reología dinámica.

Evaluación de los PHA en la biomasa y de la estabilidad de la resina de PHA

*Análisis termogravimétrico (ATG)*

Una muestra seca de biomasa rica en PHA o de resina de PHA de 2 a 5 mg se pesa y se calienta al aire o en un medio de gas inerte, tal como gas nitrógeno. Se eleva la temperatura de la muestra a 105°C y se deja que se equilibre el peso. Se evalúa la pérdida de humedad después del equilibrado del peso a 105°C. Se eleva la temperatura y se registra la pérdida de peso bajo condiciones de incremento constante de la temperatura (rampa) o de tiempo a temperatura constante (isotérmico). Para las evaluaciones de procedimiento, y para los resultados presentados en la presente exposición, se ha adoptado un protocolo estandarizado de medición de ATG. Este protocolo de ATG incluye someter una biomasa de muestra a una rampa continua y constante de 10°C/min (tras eliminar la humedad a 105°C) bajo una atmósfera de nitrógeno hasta 350°C y bajo una atmósfera de aire posteriormente a 10°C/min hasta una temperatura final de 600°C. Puede evaluarse tanto los polímeros en la biomasa como la resina de PHA extraída mediante este método estandarizado. Se consideró la pérdida de peso y la tasa de cambio de la pérdida de peso como función de la temperatura.

Típicamente se observa en el intervalo de 200°C a 300°C un pico en la tendencia de tasa de pérdida de peso de la muestra como función de la temperatura para los PHA en la biomasa y la resina de PHA. El área de este pico que se asocia a la descomposición de la masa de PHA se extrae, se normaliza y se definen los diferentes atributos característicos relacionados con la temperatura de este pico. La temperatura de descomposición ( $T_d$ ) se define como la temperatura en el punto de máxima tasa de pérdida de peso de PHA utilizando el protocolo estandarizado de ATG definido anteriormente. Las temperaturas que representan las fracciones características del área de pico total también pueden definirse, tales como los percentiles 5 ( $T_5$ ), 25 ( $T_{25}$ ), 50 ( $T_{50}$ ), 75 ( $T_{75}$ ) y 95 ( $T_{95}$ ). Se puede comparar además la fracción de área del pico a una temperatura específica, tal como la fracción de descomposición de PHA a 250°C ( $f_d^{250}$ ). Los términos  $T_5$ ,  $T_{25}$ , etc. se definen como basados en el protocolo estandarizado de medición de ATG definido anteriormente. De esta manera, para determinar  $T_5$ , por ejemplo, se somete una biomasa de muestra al protocolo estandarizado de medición de ATG. Lo mismo sería de aplicación a la determinación de la  $T_d$ .

*Medición de la viscosidad dinámica mediante reología*

De manera similar a los datos de ATG presentados, se ha aplicado un método estandarizado de medición de la viscosidad dinámica a los datos proporcionados en la presente descripción. Una muestra de PHA extraído seco de 0,6 g se prensó a una presión máxima de 1 MPa a 180°C durante dos minutos. La muestra se prensó en fundido formando un molde discoidal de 1 mm de grosor y 25 mm de diámetro. Tras el prensado, la muestra se extrajo del molde discoidal y se eliminó el material en exceso de rebaba. La muestra de disco de PHA resultante se montó en un reómetro, tal como un instrumento AR 2000 de TA Instruments y se midió la viscosidad dinámica en un barrido temporal de hasta 40 minutos a 180°C. Durante este barrido temporal, se mantuvieron constantes la amplitud de la deformación a 2% y la frecuencia a 10 Hz. La temperatura se mantuvo constante mediante enfriamiento con gas nitrógeno.

La viscosidad dinámica ( $|\eta^*|$ ), expresada en Pa·s, puede relacionarse linealmente con la masa molecular media en peso ( $M_w$ ), a condición de que el fundido sea no newtoniano:

$$M_w = m \cdot |\eta^*| + b$$

donde  $m$  y  $b$  son constantes de proporcionalidad que pueden depender del tipo de PHA y de las condiciones de la medición reológica (temperatura, frecuencia y deformación). Una reducción de  $|\eta^*|$  es equivalente a una reducción de  $M_w$ . Para un polímero dado en el que se prevé que las constantes  $m$  y  $b$  sean iguales, las diferencias de  $|\eta^*|$  indican diferencias proporcionales en la  $M_w$  del polímero.

*Evaluación de la distribución media de pesos moleculares*

Se extrajeron los PHA a partir de la biomasa seca con un disolvente orgánico a una temperatura seleccionada constante y durante un tiempo de extracción predeterminado. El polímero extraído se precipitó y se separó del disolvente mediante un método estandarizado. La influencia del pretratamiento de la biomasa y del método de

extracción sobre la reducción del peso molecular puede determinarse a partir de varios puntos de referencia relativos, tales como: (1) el coeficiente de degradación de primer orden en referencia al mismo método de extracción para diferentes tiempos de exposición, (2) el cambio en referencia a un método de extracción estandarizado, o (3) la sensibilidad térmica con una pérdida de peso molecular de referencia con un cambio en la temperatura de extracción.

5 La distribución de pesos moleculares (en referencia a estándares de poliestireno) del polímero extraído se determinó mediante cromatografía de exclusión por tamaño (CET). La CET se llevó a cabo con una bomba (Viscotek VE 1122), un detector dual refractómetro/viscosímetro (Viscotek modelo 250) y tres columnas lineales acopladas en una serie (Shodex KF-805, Shodex KF-804 y Shodex KF802.5). La temperatura del detector era 37°C, mientras que los estudios se llevaron a cabo a temperatura ambiente. El disolvente utilizado fue el cloroformo (Merck pro analysis >99%) con un caudal de 1 ml/min. El volumen de inyección era de 100 µl.

Se calibró el peso molecular en referencia a cuatro estándares de poliestireno diferentes con pesos moleculares medios conocidos, de 1.800, 650, 96 y 30,3 kg/mol, respectivamente. Se utilizó el detector que medía el índice refractivo para examinar la señal de estándar y muestra.

15 La muestra examinada mediante CET se disolvió en cloroformo hasta una concentración de 5 mg/ml a 100°C durante 10 minutos. Antes de inyectar la muestra en la columna, la solución de polímero se filtró (filtro de jeringa PALL Life Sciences Acrodisc® CR 25 mm con tamaño de poro de 0,45 µm). A partir de la distribución resuelta de pesos moleculares para los PHA de cada muestra, se calcularon las cantidades características de  $M_w$ ,  $M_n$  y PDI.

Base experimental y prueba de concepto

#### *Fuentes de biomasa y acumulaciones de PHA en la biomasa*

20 Se consideraron tres fuentes diferentes de biomasa acumuladora de PHA. Se acumularon los PHA mediante alimentación de la biomasa con fuentes seleccionadas de DQOFB bajo condiciones de limitación de nutrientes. El término nutriente se refiere a cualquier elemento para el crecimiento de biomasa que no es PHA y excluye el carbono orgánico. Por ejemplo, se han utilizado limitaciones de nutrientes en términos de requisitos de nitrógeno y/o fósforo para el crecimiento microbiano a fin de estimular una respuesta de almacenamiento de PHA en la biomasa.

25 Las fuentes de biomasa fueron las siguientes:

- Lodo activado (LA) utilizado para tratar las aguas residuales de la industria láctea en una instalación a escala de planta piloto en Suecia (LO-S). Se recibieron las muestras de LO-S y se llevaron a cabo rutinariamente experimentos de acumulación de PHA con esta biomasa durante dos años de funcionamiento de la planta piloto y 5 años de desarrollo del procedimiento a escala de laboratorio. La planta piloto consistía en un reactor por lotes de secuenciación (RLS). El RLS presentaba un volumen de trabajo de 400 l operado en ciclos de 12 horas. La retención de biomasa en el RLS se realizó mediante sedimentación por gravedad. El tiempo de retención hidráulica (TRH) nominal de las aguas residuales era de 1 día y el proceso estaba impulsado por diversas edades de los lodos (tiempos de retención de sólidos o TRS), de 1 a 8 días. Se aplicaron tasas de carga orgánica de 1 a 2 g de DQOFB/l/día y se suministraron los nutrientes según necesidad de manera que no fuesen limitantes del crecimiento microbiano en el proceso de tratamiento de aguas residuales. Esta biomasa de lodo activado mostró un potencial significativo de acumulación de PHA, de hasta aproximadamente 100% del peso seco de la biomasa sin PHA.

- Lodo activado (LA) utilizado para tratar unas aguas residuales municipales a escala real en Francia (LO-F). Se recibió una muestra de LA-F y se llevaron a cabo experimentos de acumulación de PHA en esta biomasa a escalas de laboratorio (500 ml) y piloto (100 l).

45 La planta de tratamiento municipal de aguas residuales productora de esta biomasa es de escala real y ha sido diseñada para 200.000 habitantes equivalentes. La planta gestiona el tratamiento de la contaminación de 26.750 kg de DQO/día de aguas residuales orgánicas urbanas. Un procedimiento unitario de lodos activados altamente cargados elimina el contenido orgánico fácilmente biodegradable de las aguas residuales de penetración y ello produce aproximadamente 22,2 toneladas de lodos activados de residuos (LAR) al día. Esta biomasa de lodos activados muestra un potencial de acumulación de PHA de hasta aproximadamente 67% del peso seco de la biomasa sin PHA.

- Se cultivó y produjo una biomasa de cultivo puro (CP) de *Cupriavidus necator* en Francia (CP-F) y se proporcionó como una muestra de biomasa de CP secada tras la acumulación de PHA. *Cupriavidus necator* es un procarionta Gram-negativo que ha sido utilizado durante muchos años en la investigación de cultivos puros para la producción de PHA. Este cultivo puro muestra un potencial excesivo de acumulación de PHA de hasta aproximadamente 400% del peso seco de biomasa sin PHA.

55 Se acumularon los PHA en la biomasa aeróbicamente. La biomasa de LA de Suecia y Francia (LA-S y LA-F) se acumuló con PHA en un reactor de alimentación por lotes de 100 l utilizando aguas residuales de industria láctea fermentadas o aguas residuales industriales como sustratos. Ambos sustratos son ricos en AGV. Simultáneamente, ambas fuentes son deficientes en su contenido de nutrientes, lo que implica que el crecimiento microbiano estaba

limitado por nutrientes al alimentar la biomasa con estas aguas residuales. De esta manera, se utilizaron los AGV de las aguas residuales como DQOFB para la acumulación de PHA en la biomasa y se mitigó la respuesta de crecimiento microbiano durante la respuesta de acumulación. Los ciclos de acumulación eran de 5 a 24 horas y el nivel final de PHA en la biomasa era de 30% a 60% de la biomasa seca después de la acumulación. Tras un ciclo de acumulación, se interrumpió la aireación y la biomasa se sedimentó por gravedad. Los niveles de AGV residuales en el reactor al final de la acumulación eran despreciables. Se decantaron las aguas residuales tratadas suprayacentes. La biomasa sedimentada por gravedad y espesada fue la alimentación bruta inicial para la evaluación de la estabilidad de los PHA en la biomasa y la recuperación de resina de PHA a partir de esta biomasa rica en PHA.

El CP-F se alimentó por lotes con ácido butírico como fuente de DQOFB a escala de laboratorio. Al final de la acumulación, se centrifugó la biomasa y se decantó el sobrenadante. La biomasa espesada de *C. necator* rico en PHA se liofilizó directamente. Esta biomasa liofilizada se utilizó como materia prima para considerar la estabilidad de PHA en esta biomasa de cultivo puro rico en PHA.

#### *Estabilidad térmica de los PHA en la biomasa y la fracción inorgánica de la biomasa*

El ATG de las muestras de biomasa proporciona información de la fracción inorgánica de la biomasa y de la cantidad y estabilidad térmica de los PHA en la biomasa. Se estimó la fracción inorgánica de la biomasa a partir del peso residual de la muestra después de alcanzar una temperatura del horno de 600°C (figura 3). La expresión fracción inorgánica o ceniza de biomasa se utilizará para referirse al residuo estimado de la muestra de ATG remanente tras llevar la muestra a 600°C en aire. Después de estimar el contenido de ceniza, se consideró adicionalmente el peso de muestra menos el contenido estimado de ceniza, es decir, el peso orgánico estimado de la muestra. El ATG indicaba una reducción progresiva del peso orgánico relativo de la muestra que tendía asintóticamente a un peso relativo de cero. La cantidad y calidad de los PHA en la biomasa pueden evaluarse a partir de la tasa de pérdida de masa como función de la temperatura (figuras 4 y 5). Siguiendo el método estándar de los presentes inventores para el ATG con una rampa de 10°C/min, se identificaron los PHA en la biomasa como un pico característico de tasa de pérdida de peso que se produce típicamente entre 200°C y 300°C. A mayor temperatura del pico de PHA, más estable térmicamente son los PHA en la biomasa. Para el propósito de la presente descripción, la temperatura de descomposición ( $T_d$ ) de los PHA en la biomasa se define como la temperatura de máxima tasa de pérdida de peso para los PHA en la biomasa aunque la descomposición se inicia a una temperatura inferior a esta temperatura y continúa después. Las temperaturas de descomposición de PHA características también pueden definirse mediante percentiles de descomposición para los PHA en la biomasa, tales como los percentiles 5 ( $T_5$ ), 25 ( $T_{25}$ ), 50 ( $T_{50}$ ), 75 ( $T_{75}$ ) y 95 ( $T_{95}$ ). En algunos casos también resulta informativo identificar la descomposición fraccionada de PHA a una temperatura fija, tal como 250°C ( $f_d^{250}$ ). A partir de la tendencia en el ATG de contenido orgánico de la biomasa, se observó una fracción orgánica de PHA de la biomasa y una fracción orgánica que no es PHA, y la estabilidad térmica de los PHA en la biomasa.

La estabilidad térmica de los PHA en la biomasa durante la acumulación se correlacionaba negativamente con el nivel de materia inorgánica asociada a la biomasa. En general, los niveles reducidos de materia inorgánica en la biomasa resultaron en una estabilidad térmica más alta de los PHA. La fracción inorgánica de la biomasa se redujo significativamente mediante la reducción del pH del licor mixto antes de la deshidratación y secado finales (figura 6).

Se llevaron a cabo réplicas de experimentos de acumulación con LA-S. Se acumularon los PHA en la biomasa utilizando aguas residuales de industria química ricas en ácido butírico o aguas residuales de la industria láctea ricas en ácidos butírico y acético. El pH durante la acumulación de PHA no estaba controlado, pero típicamente se encontraba dentro del intervalo de pH 7,5 a pH 9. Al final de cada acumulación de PHA, se centrifugó una muestra de biomasa y se decantó el sobrenadante. El pellet concentrado remanente se secó a 70°C. Se observó que la estabilidad térmica de los PHA en la biomasa no era consistente, sino que variaba para cada tanda. En paralelo con la acumulación de PHA (g-VSS), también se observó que la biomasa se asociaba a niveles incrementados de materia inorgánica en grado variable para cada experimento. La estabilidad térmica de los PHA en la biomasa al final del experimento de acumulación se correlacionaba negativamente con el nivel de asimilación concurrente de materia inorgánica (g-ceniza) por la biomasa. El único valor atípico sugirió que el tipo de materia inorgánica, y no sólo el nivel, necesitan considerarse más a fondo (figura 7).

#### *Foco en la fracción inorgánica de la biomasa*

Con el fin de entender mejor el papel del contenido de ceniza en la biomasa con respecto a la estabilidad térmica de los PHA en la biomasa, se enviaron muestras de biomasa de diferentes experimentos de acumulación para el análisis elemental. Se seleccionaron muestras deshidratadas y secas de biomasa obtenidas antes de la acumulación de PHA (2 muestras), después de la acumulación de PHA (3 muestras) y después de la acidificación del licor mixto previa a la deshidratación final (3 muestras).

La composición inorgánica relativa de la biomasa era consistente y estaba dominada por calcio y fósforo, seguido de potasio, hierro y magnesio (figura 8). Los siguientes en abundancia relativa eran el cobre, el cinc y el aluminio, representando niveles de contenido relativo de aproximadamente 1%. Manganeso, bario, estroncio, cobalto, níquel, cromo y molibdeno eran componentes menores, a niveles relativos de una fracción de 1%. Los metales de los grupos I y II, tales como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Na}^{+1}$  son elementos que es conocido de la bibliografía que influyen sobre la estabilidad

térmica de los PHA. La estabilidad térmica de los PHA también se ha demostrado anteriormente que prácticamente no resulta afectada por los metales  $Zn^{2+}$ ,  $Sn^{2+}$  o  $Al^{3+}$ . La evaluación de contenido relativo de calcio de la biomasa antes de la acumulación fue la más variable. Sin embargo, la acumulación de PHA aparentemente estaba asociada a una tendencia consistente de incremento marcado del componente relativo de calcio y fósforo del contenido inorgánico. De manera similar, la acidificación del licor mixto después de la acumulación de los PHA, antes de la deshidratación y secado finales, se observó que fomentaba una reducción significativa del contenido relativo de calcio del contenido de ceniza de la biomasa.

Desde por lo menos una perspectiva de química del agua, estas observaciones de incremento del calcio durante el procedimiento de acumulación son previsibles. El procedimiento de acumulación convierte la DQOFB en el agua en PHA y dióxido de carbono. A pH incrementado, mayores fracciones del dióxido de carbono producido resultarán retenidas en solución en forma de carbonato. La tendencia a la formación de mineral de carbonato de calcio se incrementará a mayor concentración de calcio y/o carbonato. El pH alcalino fomenta la formación de mineral, mientras que el pH ácido favorece la solubilidad de los minerales. Otros minerales del calcio, incluyendo el fosfato de calcio, también pueden formarse con una tendencia similar de solubilidad incrementada a menor pH. Otros cationes como el magnesio se comportarán de manera similar al calcio.

El contenido de calcio de la biomasa se correlacionaba fuertemente con el fósforo, potasio, magnesio, manganeso, bario y estroncio. Debido a que el calcio dominaba el contenido de ceniza de la biomasa, siendo conocido además como un elemento que puede influir sobre la estabilidad térmica de los PHA, se consideró la relación aparente entre el contenido medido de calcio de la biomasa y la estabilidad térmica de los PHA en la biomasa (figuras 9 y 10). Las tendencias aparentemente no eran sensibles a diferencias en el contenido de PHA de la biomasa, que era de 40% a 50% en estas muestras.

La reducción del contenido de mineral de calcio en la biomasa se asociaba a un incremento progresivo del intervalo de temperaturas que representan descomposición de los PHA en la biomasa. El efecto aparentemente no era progresivo, sino que disminuía hasta valores limitantes. La descomposición de los PHA en la biomasa se desplazó desde un intervalo inferior de temperaturas de 210°C a 230°C hasta un intervalo de temperaturas de 270°C a 290°C (figura 9). El grado de descomposición de los PHA en la biomasa a 250°C se redujo de 100% a menos de 10% (figura 10).

En caso de que PHA se vaya a extraer de la biomasa utilizando un disolvente orgánico a temperaturas superiores a 100°C, y la descomposición térmica de los PHA en la biomasa deba evitarse, resulta necesaria una estabilidad térmica elevada de los PHA en la biomasa. La estabilidad térmica de los PHA en la biomasa en réplicas de experimentos de acumulación era variable, con una  $T_d$  de 220°C a 260°C. La acidificación del licor mixto antes de la deshidratación y secado finales de la biomasa incrementó la  $T_d$  hasta un nivel consistente superior a 280°C. El grado de acidificación requerido puede definirse operacionalmente como una reducción del pH que da lugar a una biomasa seca con una temperatura de descomposición de los PHA en la biomasa superior a 270°C, aunque preferentemente superior a 280°C.

#### *El papel de la estabilidad térmica de los PHA en la biomasa antes de la extracción con disolvente*

La importancia del acondicionamiento de la biomasa para incrementar la estabilidad térmica de PHA se ilustró de manera similar mediante los experimentos de acumulación realizados con la biomasa LA-F (figuras 11, 12 y 13). Las muestras de biomasa, secas a 70°C, se obtuvieron antes de la acumulación de PHA, después de la acumulación de PHA y deshidratación (muestra de control) en los que el pH era de entre 7 y 9, y después de la acumulación de PHA con un ajuste del pH a 3 y etapas de concentración posteriores, incluyendo la flotación en gas disuelto y la centrifugación hasta 150 g/l. Durante la acumulación, la fracción inorgánica de la biomasa se redujo progresivamente y la acidificación dio como resultado una reducción adicional que rindió el incremento más significativo de la temperatura de descomposición de los PHA en la biomasa.

El fracaso en la consecución de una estabilidad térmica más alta de los PHA en la biomasa dio como resultado una pérdida significativa de peso molecular durante la extracción a 125°C durante 2 horas utilizando sistemas de disolvente (no clorados) de acetona o carbonato de 1,2-propileno. También se observó cierta reducción del peso molecular para la extracción con diclorometano a 40°C. Las purzas de la resina de PHA para las extracciones de control y de licor mixto (LM) acidificado fueron de 96 y 93 (diclorometano), de 96 y 97 (acetona) y de 97 y 95 (carbonato de propileno) por ciento, respectivamente. La polidispersidad de la resina de PHA era de  $1,8 \pm 0,2$ . En todos los disolventes de extracción respectivos sometidos a ensayo en este experimento, el preacondicionado de la biomasa mediante acidificación del licor mixto (LM) rindió resultados superiores (figura 13). El rendimiento de extracción de polímero puede incrementarse con un tiempo de extracción más prolongado y se ha observado que la pérdida de peso molecular sigue una cinética de primer orden. Por lo tanto, en ocasiones puede ser inevitable un equilibrio entre el rendimiento de extracción y la pérdida de peso molecular. Estos equilibrios pueden mitigarse mediante una estabilidad térmica mejorada de los PHA en la biomasa antes de la extracción.

Sin embargo, la pérdida de peso molecular (figura 13) no influyó sobre la  $T_d$  de la resina de PHA extraída (figura 14). La acidificación del licor mixto (LM) dio como resultado una  $T_d$  de los PHA en la biomasa más alta y la extracción con acetona dio como resultado una resina de PHA con una estabilidad térmica todavía más mejorada (figura 14). En

contraste, la extracción con diclorometano y con carbonato de propileno dio como resultado una estabilidad térmica de la resina de PHA que era más similar a la  $T_d$  de los PHA en la biomasa. La  $T_d$  para la resina de PHA después de la extracción no se correlacionó con la fracción de masa residual no PHA derivada mediante ATG.

5 De esta manera, el acondicionamiento de la biomasa para mejorar la estabilidad térmica de los PHA en la biomasa puede reducir el grado de pérdida de peso molecular durante el secado de la biomasa y la extracción con disolvente. Además, el preacondicionamiento que conduce a una mejora de la  $T_d$  de los PHA en la biomasa se traduce en la resina de PHA después de la extracción. Adicionalmente, la acetona como disolvente de extracción de los PHA mostró un atributo claro de mejora adicional de la estabilidad térmica de la resina de PHA superior a la  $T_d$  inicial de los PHA en la biomasa. La pureza de la resina de PHA extraída no era indicativa de la  $T_d$  resultante.

10 Los parámetros de ATG para la evaluación de la resina de PHA extraída que se encontró que eran indicativos de una estabilidad mejorada de la resina de PHA fundida son la fracción de descomposición de PHA a 250°C ( $f_d^{250}$ ) y la temperatura a la que la descomposición de la resina de PHA es de 5% ( $T_5$ ). A mayores  $T_5$  y menores  $f_d^{250}$ , mejor será la calidad de la estabilidad de la resina de PHA fundida. La extracción con acetona proporcionó una  $f_d^{250}$  de la resina de PHA consistentemente baja en ambos casos. El preacondicionamiento de la estabilidad térmica de los PHA en la biomasa y el tipo de disolvente utilizado pueden influir sobre la calidad de procesamiento resultante de la resina de PHA.

#### *Principios de ensayos sobre la biomasa de cultivo puro*

20 El procedimiento de producción de PHA se ha establecido junto con las actividades de gestión de los lodos en las instalaciones de tratamiento de aguas residuales. Sin embargo, los presentes inventores sin perjuicio de lo anterior deseaban clarificar si los principios de la presente descripción eran igualmente relevantes para la producción de PHA basada en procedimientos de fermentación de cultivos puros para la producción de PHA. Con este fin, se deshidrató mediante centrifugación una muestra de CP-F y se liofilizó directamente tras la acumulación de PHA. La fracción orgánica de la biomasa CP-F era de aproximadamente 81% de PHA en peso. El principio de preacondicionamiento de los PHA en la biomasa se sometió a ensayo, aunque partiendo de una biomasa ya seca.

25 El CP-F se dividió en 3 fracciones: una referencia, un enjuague con agua desionizada y un enjuague con agua ácida. La referencia era la biomasa de CP-F sin modificación evaluada y extraída sin ninguna forma de preacondicionamiento. El enjuague se llevó a cabo combinando 45 ml de solución de enjuague (agua desionizada o ácido clorhídrico 0,001 N, respectivamente) por gramo de biomasa y mezcla continua a temperatura ambiente durante 25 minutos. Finalmente, después del enjuague, estas fracciones de biomasa se deshidrataron mediante centrifugación; seguidamente se decantaron los sobrenadantes y la biomasa retenida se secó a 70°C.

30 La estabilidad térmica de los PHA en la biomasa se examinó mediante ATG (figura 15). El enjuague de la biomasa de CP-F estimuló una mejora significativa de la estabilidad térmica de los PHA en la biomasa. La mejora es análoga a los resultados en LA-S y LA-F para la acidificación del licor mixto antes de la deshidratación y secado finales de la biomasa. Respecto a los LA-S y LA-F, un enjuague ácido del CP-F proporcionó la mayor mejora de la estabilidad térmica de los PHA en la biomasa. El grado de mejora de la temperatura de descomposición ( $T_d$ ) de los PHA en la biomasa no fue tan alto como el alcanzado para la biomasa de LO. Se consiguió una  $T_d$  de los PHA en la biomasa próxima a 280°C para los LA-S y LA-F, mientras que el CP-F alcanzó una  $T_d$  de prácticamente 270°C tras el enjuague ácido (figuras 15 y 16). Esta diferencia podría haberse visto influida por el acondicionamiento de una biomasa que ya estaba seca, en lugar de preacondicionarla directamente después de la acumulación, como en los experimentos con LA-S y LA-F. Sin embargo, el grado de descomposición de los PHA en la biomasa a 250°C fue similar al de los LA, siendo inferior a 10% después del acondicionamiento ácido (figura 17). El preacondicionamiento del CP-F antes de la extracción con disolvente dio como resultado de manera similar una fracción inorgánica reducida de la biomasa (figura 16) y la fracción orgánica de PHA se incrementó ligeramente hasta 83%. Las observaciones y principios fundamentales de la manipulación de la estabilidad térmica de los PHA en la biomasa se reprodujeron y se encontró que eran igualmente válidos para la extracción con disolvente de cultivo puro de la resina de PHA.

35 Se extrajeron los PHA de la biomasa de CP-F a temperatura baja (40°C) y a temperatura alta (125°C) utilizando tres sistemas de disolventes diferentes (diclorometano a 40°C, acetona a 125°C y 2-butanol a 125°C). El polímero extraído se analizó mediante CET para la distribución de los pesos moleculares (figura 18), así como mediante ATG para la estabilidad térmica y la pureza de la resina de PHA (figuras 19 y 20). El peso molecular medio más alto se obtuvo con la extracción con diclorometano a temperatura baja de biomasa de CP-F liofilizada. En contraste con la biomasa de LA-F (figura 13), la extracción con acetona resultó en una pérdida de únicamente 10% del peso molecular que era insensible al enjuague con agua desionizada y al enjuague con agua ácida de la biomasa. Sin embargo, la influencia del enjuague de la biomasa sobre el peso molecular medio extraído resultó más evidente para la extracción con 2-butanol. Tras el enjuague ácido de la biomasa de CP-F, la extracción con 2-butanol rindió PHA con una distribución de pesos moleculares similar a aquella sometida a la extracción de referencia con diclorometano. Aunque los PHA eran más susceptibles a la pérdida de peso molecular en 2-butanol a temperaturas elevadas, el preacondicionamiento de la biomasa de CP-F mejoró la estabilidad de los PHA para la extracción con 2-butanol. La polidispersidad de todas las muestras se mantuvo relativamente constante a  $1,8 \pm 0,3$ .

El preacondicionamiento de enjuague muestra el potencial de mitigar la pérdida de peso molecular medio de los PHA

durante los procedimientos de extracción con disolvente a temperaturas superiores a 100°C. A pesar de los potenciales beneficios de conservación del peso molecular, el preacondicionamiento de enjuague podría servir para producir unos PHA extraídos con resistencia a la descomposición en el fundido durante el procesamiento posterior. La figura 19 contrasta las diferencias entre las estabildades térmicas de los PHA en la biomasa y de la resina de PHA después de las extracciones respectivas. De manera similar a los resultados para las extracciones con carbonato de propileno de los LA-F comentados anteriormente, las extracciones con diclorometano y con 2-butanol siguieron las tendencias de la  $T_d$  de los PHA en la biomasa. La  $T_d$  de la resina de PHA para las extracciones con 2-butanol reflejan la  $T_d$  actual de los PHA en la biomasa antes de la extracción. La  $T_d$  de los PHA en la biomasa mejoró con el acondicionamiento de la biomasa, aunque durante las extracciones con diclorometano, la  $T_d$  de la resina de PHA fue consistentemente la más baja. De acuerdo con los resultados de extracción de LA-F informados, la extracción con acetona incrementó la  $T_d$  de la resina de PHA por encima de la estabilidad térmica respectiva de los PHA en la biomasa.

El CP-F tras enjuague ácido y extracción con acetona mostró la  $T_d$  más alta, de 283°C, comparada con una  $T_d$  de 255°C para el CP-F extraído con el disolvente de referencia diclorometano. La estabilidad térmica mejorada de la resina de PHA extraída no estaba asociada a una pureza mejorada del producto extraído (figura 19). Por lo tanto, la pureza química de la resina de PHA no es sinónima de una estabilidad funcional mejorada, que implica cuestiones prácticas tales como la estabilidad del fundido. Una resina de PHA más pura no es necesariamente mejor desde la perspectiva práctica del procesamiento de plásticos.

Los parámetros de la ATG para el análisis de la resina de PHA extraída que se encontró que eran indicativos de una estabilidad del fundido mejorada son la fracción de descomposición de los PHA a 250°C ( $f_d^{250}$ ) y la temperatura de descomposición de 5% de la resina de PHA ( $T_5$ ). Con una  $T_5$  más alta y una  $f_d^{250}$  más baja, mejor será la calidad de la resina de PHA para la estabilidad del fundido. La figura 20 ilustra la asociación entre la  $f_d^{250}$  y la  $T_5$  según el método de enjuague y el disolvente para la extracción. Un enjuague ácido del CP-F, el secado y la extracción con acetona proporcionaron resultados óptimos para  $f_d^{250}$  y  $T_5$ , aunque la pureza no era tan buena como la del CP-F extraído con acetona o con el disolvente de referencia diclorometano (figura 21).

Por lo tanto, la pureza de la resina de PHA es quizá un factor menor que el tipo de impureza si debe considerarse la calidad funcional como atributo del producto. Además, se obtuvieron resultados equivalentes de conservación del peso molecular para la extracción con disolvente caliente al preacondicionar los PHA en la biomasa para la mejora de la estabilidad térmica. A mayor estabilidad térmica de los PHA en la biomasa, la resina de PHA tiende a ser más estable térmicamente. Simultáneamente, el tipo de disolvente utilizado para la extracción puede influir sobre el resultado.

En vista de la importancia práctica de la estabilidad de la resina de PHA fundida y de que la estabilidad térmica no se correlacionaba bien con la pureza de la resina de PHA extraída, se investigó adicionalmente la pureza entre los PHA de cultivo mixto de los presentes inventores y los PHA de cultivo puro comercial, analizando además la asociación entre los datos de ATG de descomposición, la reología del polímero fundido y la estabilidad del fundido.

#### *Impurezas inorgánicas y estabilidad térmica de la resina de PHA*

Se analizó el contenido de elementos inorgánicos de una muestra de resina de PHA de LA-S (CM-PHA-AK), así como de dos grados comerciales diferentes de resina de PHA (CP-PHA-1 y CP-PHA-2) (figuras 22 y 23). El CM-PHA-AK se deriva de un cultivo mixto de tratamiento de aguas residuales de la industria láctea y los PHA comerciales se produjeron mediante procedimientos de fermentación de cultivo puro (CP). La ATG del contenido no PHA de estas muestras se basa en la fracción de material residual con respecto al peso de la muestra a 200°C después del pico de pérdida de peso de PHA y a una temperatura de la ATG de 350°C. El contenido no PHA del análisis elemental se refiere a la fracción no PHA basada en la masa de elementos detectada (figura 23). En términos de pureza absoluta (figura 22), el CP-PHA-1 era excepcionalmente puro, mientras que las otras dos muestras presentaban una pureza comparable. Sin embargo, el contenido no PHA estimado mediante ATG no se correlacionaba con la suma de masas inorgánicas no PHA basada en el análisis elemental.

Basándose en la pureza aparente de PHA derivada del análisis elemental (figura 23), el orden de pureza de las resinas de PHA cambió a CM-PHA-AK, CP-PHA-1 y CP-PHA-2, con 247, 559 y 1.642 mg/kg de masa inorgánica cuantificada. La composición elemental relativa varió, aunque se encontró que los contribuyentes principales eran calcio, sodio, magnesio, fósforo, potasio, hierro y aluminio. La variación del contenido de calcio de las muestras de PHA se correlacionaba fuerte y positivamente con Na, Mg, P, K, Zn, Pb, Cu y Mn. El contenido de calcio de los PHA también se correlacionaba fuerte y negativamente con la estabilidad térmica de la resina de PHA (figura 24). Por lo tanto, al contrario que el orden de purezas absolutas, la calidad funcional de las resinas de PHA se relacionaba con el contenido elemental (figura 23), en las que el calcio era un elemento dominante.

Con el fin de evaluar la naturaleza de la asociación de estos elementos con la resina de PHA, se enjuagaron los PHA comerciales con agua desionizada o acidificada, se secaron nuevamente y después se sometieron a ensayo nuevamente para los cambios de estabilidad térmica. El enjuague y secado de CP-PHA-1 mejoró la estabilidad térmica de la resina de PHA, aunque introdujo un ligero incremento del contenido no PHA (figuras 25 y 26). La mejora de la estabilidad era más significativa con un enjuague ácido, lo que concuerda en paralelo con la influencia sobre la estabilidad térmica de los PHA en la biomasa. La pureza absoluta de la resina de PHA no es necesariamente indicativa de una estabilidad térmica mejorada. Los elementos que aparentemente influyen sobre la estabilidad térmica de la

resina de PHA no se encuentran unidos estrictamente, sino que se desasimilan fácilmente del polímero mediante lavado a pH reducido. Es conocido que algunos minerales de cationes, tales como calcio y magnesio, se vuelven más solubles en ácido.

5 Con el fin de establecer el hecho de que la asociación de cationes con los PHA influye sobre la estabilidad térmica, se llevó a cabo el experimento inverso (figura 27). La resina de PHA se disolvió en cloroformo a 100°C y se añadió lentamente metanol que contenía 0, 40, 400 o 4.000 ppm (calculados según la cantidad de polímero) de CaCl<sub>2</sub> (como Ca<sup>2+</sup>), MgCl<sub>2</sub> (como Mg<sup>2+</sup>), FeSO<sub>4</sub> (como Fe<sup>2+</sup>) y NH<sub>4</sub>Cl (como NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) al cloroformo bajo agitación continua para estimular la precipitación del polímero. El polímero se transfirió a una placa Petri y se evaporó el disolvente durante 24 h a 70°C. Se utilizaron las diferentes concentraciones de soluciones iónicas para proporcionar niveles más elevados de iones específicos en asociación con la resina de PHA precipitada. El incremento de los iones respectivos que se asociaron a la resina de PHA era consistente en este experimento controlado con un incremento observado en la ATG de contenido no PHA del polímero. El calcio y el magnesio tuvieron una influencia similar y la más significativa en una base en masa sobre la reducción de la estabilidad térmica. Simultáneamente, el procedimiento de disolución y reprecipitación de la resina de PHA sin ningún ion añadido inesperadamente también mostró una influencia negativa sobre la estabilidad térmica. Sin embargo, un incremento paralelo del contenido no PHA de estas muestras de control sugiere una fuente de contaminación. La resina de PHA aparentemente es sensible a la contaminación con iones particulares a niveles bastante bajos.

20 Los resultados de estabilidad térmica de la resina de PHA eran consistentes con los resultados de estabilidad térmica de los PHA en la biomasa. La materia inorgánica, en particular cationes tales como el calcio y el magnesio debido a la dominancia observada en el análisis elemental de la resina de PHA y la biomasa, desempeñan un papel en la estabilidad térmica del polímero. La reducción del nivel de estos iones en la biomasa o en la resina de PHA sirve para incrementar la estabilidad térmica. La reducción del contenido inorgánico, en términos de estos iones, de la biomasa rica en PHA puede reducir el grado de pérdida de peso molecular durante el secado de la biomasa y la extracción con disolvente. La estabilidad térmica mejorada de los PHA en la biomasa progresa (extracciones con diclorometano, 2-butanol y carbonato de propileno) o incluso se incrementa adicionalmente (extracción con acetona) en la estabilidad térmica de la resina de PHA. Por lo tanto, conseguir una estabilidad térmica elevada de los PHA en la biomasa es equivalente a producir una resina de PHA de estabilidad térmica equivalente o incluso más elevada.

30 Aunque se produzca una resina de PHA con estabilidad térmica inferior, los presentes inventores han encontrado que los iones responsables de este efecto aparentemente no se unen fuertemente al polímero. Estos iones pueden, por lo menos en cierta medida, eliminarse por enjuague del polímero con un lavado acuoso. Un lavado acuoso ácido muestra una influencia más fuerte, lo que sugiere que los iones responsables son más solubles a un pH más bajo. El polímero enjuagado puede secarse nuevamente y mostrará una mejora marcada de la estabilidad térmica. Pueden conseguirse los mismos efectos para los PHA en la biomasa con la ventaja adicional de la conservación del peso molecular con el secado y extracción con disolvente a temperatura elevada, así como en menores necesidades externas posteriores al procedimiento, tales como un lavado adicional de la resina y nuevo secado.

#### *Estabilidad térmica de la resina de PHA en relación a la estabilidad del fundido*

40 Se llevó a cabo trabajo adicional para obtener una mejor comprensión de cómo una mejor estabilidad térmica podría relacionarse con una resina de PHA de calidad funcional superior para el procesamiento. La calidad funcional se refiere a la estabilidad de los PHA en el fundido, tal como se requeriría para el procesamiento. Se examinó la viscosidad dinámica mediante reología de muchas muestras de resina de PHA derivadas de un cultivo puro disponible comercialmente, así como de resina de PHA derivada del cultivo mixto (lodo activado) de los presentes inventores.

45 La viscosidad dinámica inicial de la resina de PHA en el fundido puede correlacionarse con el peso molecular medio del polímero. La reducción de la viscosidad dinámica con el tiempo en el fundido, a temperatura y deformación constante, se correlaciona con la pérdida de peso molecular medio. Un resultado típico de la resina de PHA derivada de LA-S se muestra en la figura 28. Con el fin de reducir esta tendencia a un solo número que pueda utilizarse para reflejar la calidad funcional, o la estabilidad de la resina de PHA fundida, se midió la *estabilidad del fundido 1-log*, en minutos. La estabilidad 1-log del fundido es el tiempo para que la viscosidad dinámica de los PHA se reduzca en un orden de magnitud en referencia a los métodos específicos de ensayo reológico de polímeros utilizados en la presente memoria. Resultó inmediatamente evidente que, mediante el preacondicionamiento de la estabilidad térmica de los PHA en la biomasa seguido de la extracción con acetona, se producían PHA funcionalmente superiores a por lo menos 2 resinas de PHA comerciales (figura 29).

55 Se evaluaron los resultados de la estabilidad de la resina de PHA fundida para muchas muestras diferentes y procedentes de diferentes fuentes de biomasa, incluyendo cultivos puros y mixtos. Tal como se observa para la estabilidad térmica de la resina de PHA, la estabilidad del fundido 1-log no puede relacionarse de manera general con el porcentaje de contenido de material no PHA (figura 30). El contenido no PHA según la ATG se basa en la fracción de material residual con respecto al peso de muestra a 200°C, después del pico de pérdida de peso de PHA y a una temperatura de la ATG de 350°C. Aunque la pureza de la resina de PHA puede estar relacionada con las cuestiones de propiedades materiales según el uso deseado de la materia prima, la pureza aparentemente era un mal indicador absoluto de la calidad funcional para el procesamiento. Una pureza de una resina de PHA más baja no es necesariamente indicativa de una estabilidad térmica más baja del polímero. Los plásticos derivados de la combinación

60

de resina de PHA pueden contener un componente PHA significativamente reducido, lo que hace que resulte todavía menos relevante si la resina de PHA inicial es pura al 96% o al 99%. Lo que aparentemente era más relevante para la producción de compuesto plástico era el rendimiento y estabilidad de los PHA en el fundido.

5 Con una abundancia de resultados de ATG de la resina de PHA, y debido a que los datos del análisis ATG son más fáciles de obtener con menos material de muestra que las mediciones de viscosidad dinámica, se estableció una asociación empírica entre los resultados de estabilidad térmica y estabilidad del fundido 1-log (figuras 31 y 32). Estos resultados sugieren que, con una  $T_5$  superior a 260°C (y preferiblemente superior a 262°C), la estabilidad del fundido 1-log muy probablemente excederá de 15 minutos. La  $f_d^{250}$  sugiere además 4 zonas de calidad de la resina de PHA a partir de los datos de ATG en relación a las estabilidades de fundido 1-log:

10	Zona 1:	$0,1 < f_d^{250} < 1,0$	$0 < \text{estabilidad del fundido 1-log} < 5$ minutos
	Zona 2:	$0,012 < f_d^{250} < 0,1$	$5 < \text{estabilidad del fundido 1-log} < 15$ minutos
	Zona 3:	$0,01 < f_d^{250} < 0,012$	$15 < \text{estabilidad del fundido 1-log} < 25$ minutos
	Zona 4:	$0,001 < f_d^{250} < 0,01$	$25 < \text{estabilidad del fundido 1-log} < 35$ minutos

15 La variabilidad observada de los datos dificulta la discriminación fiable de las zonas 3 y 4. Podría afinarse adicionalmente las zonas de calidad presentadas utilizando un análisis más sofisticado de los datos de ATG. También podría ser que la variabilidad de los datos experimentales en torno a la línea de tendencia en la figura 32 se deba al potencial de limitación de la relación de señal a ruido de la medición de ATG misma con los equipos utilizados para el presente estudio. Sin embargo, estos resultados de calidad funcional de la resina de PHA indican que se prevé un producto superior con una  $T_5$  superior a 260°C y una  $f_d^{250}$  igual o inferior a 0,011. El preacondicionamiento de los PHA en la biomasa para una estabilidad térmica más elevada de los PHA en la biomasa es una vía eficaz para conseguir  
 20 fiablemente como mínimo una resina de PHA de zona 3.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un método de incremento de la estabilidad química y/o térmica de los PHA (polihidroxiclcanoato) en la biomasa hasta una temperatura de descomposición superior a 260°C, donde la biomasa está contenida en un licor mixto, comprendiendo el método:
- 10 a. solubilizar los iones asociados a la biomasa en el licor mixto mediante el tratamiento del licor mixto mediante reducción del pH del licor mixto a menos de 6; y
- 10 b. deshidratar el licor mixto y separar eficazmente por lo menos algunos de los iones de los PHA en la biomasa, lo que da como resultado una estabilidad química y/o térmica incrementada de los PHA en la biomasa.
2. El método según la reivindicación 1, que incluye además secar la biomasa a temperaturas iguales o superiores a 100°C.
3. El método según la reivindicación 1 o 2, que incluye además extraer los PHA de la biomasa mediante la utilización de un disolvente no clorado a una temperatura superior a 100°C.
- 15 4. El método según la reivindicación 1, que incluye:
- 20 a. deshidratar el licor mixto, donde el agua mixta comprende 2 a 10 g/l de sólidos en suspensión totales (SST) y el PHA está en exceso de 40% de dichos SST en una base de peso seco, y donde el licor mixto presenta un pH superior a 7 pero inferior a 10, para la obtención de un licor mixto que comprende más de 1% pero menos de 10% de sólidos secos;
- 20 b. después de deshidratar el licor mixto, reducir el pH del licor mixto entre 2 y 5,
- c. después de reducir el pH del licor mixto a entre 2 y 5, deshidratar adicionalmente el licor mixto mediante flotación en gas disuelto, para la obtención de un licor mixto que comprende más de 4% de sólidos secos;
- d. después de la deshidratación adicional del licor mixto, secar la biomasa a una temperatura superior a 100°C, para la obtención de un licor mixto que comprende más de 95% de sólidos secos; y
- 25 e. después del secado del licor mixto, extraer los PHA con un disolvente orgánico no clorado a temperaturas superiores a 100°C.

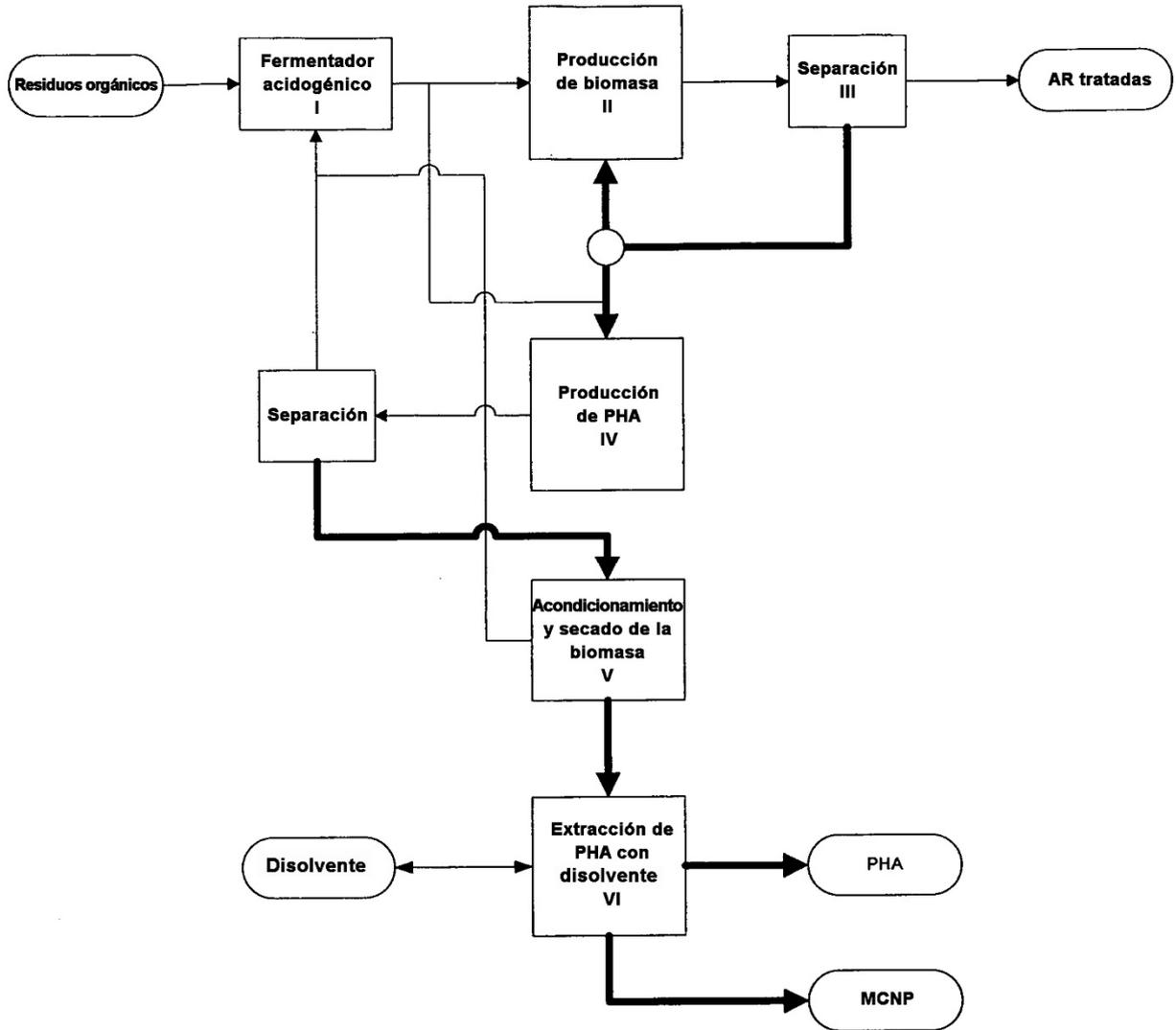


Figura 1

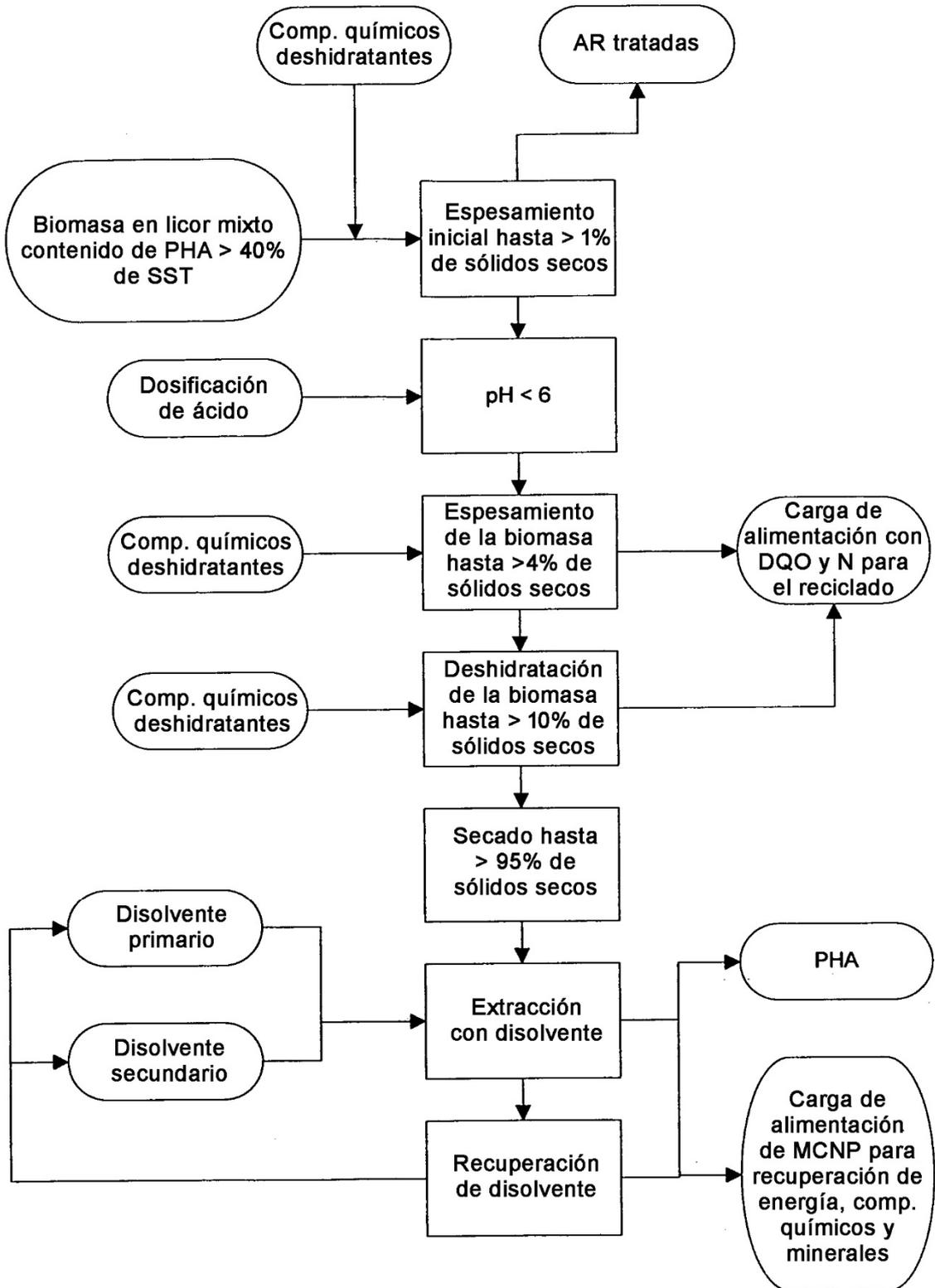


Figura 2

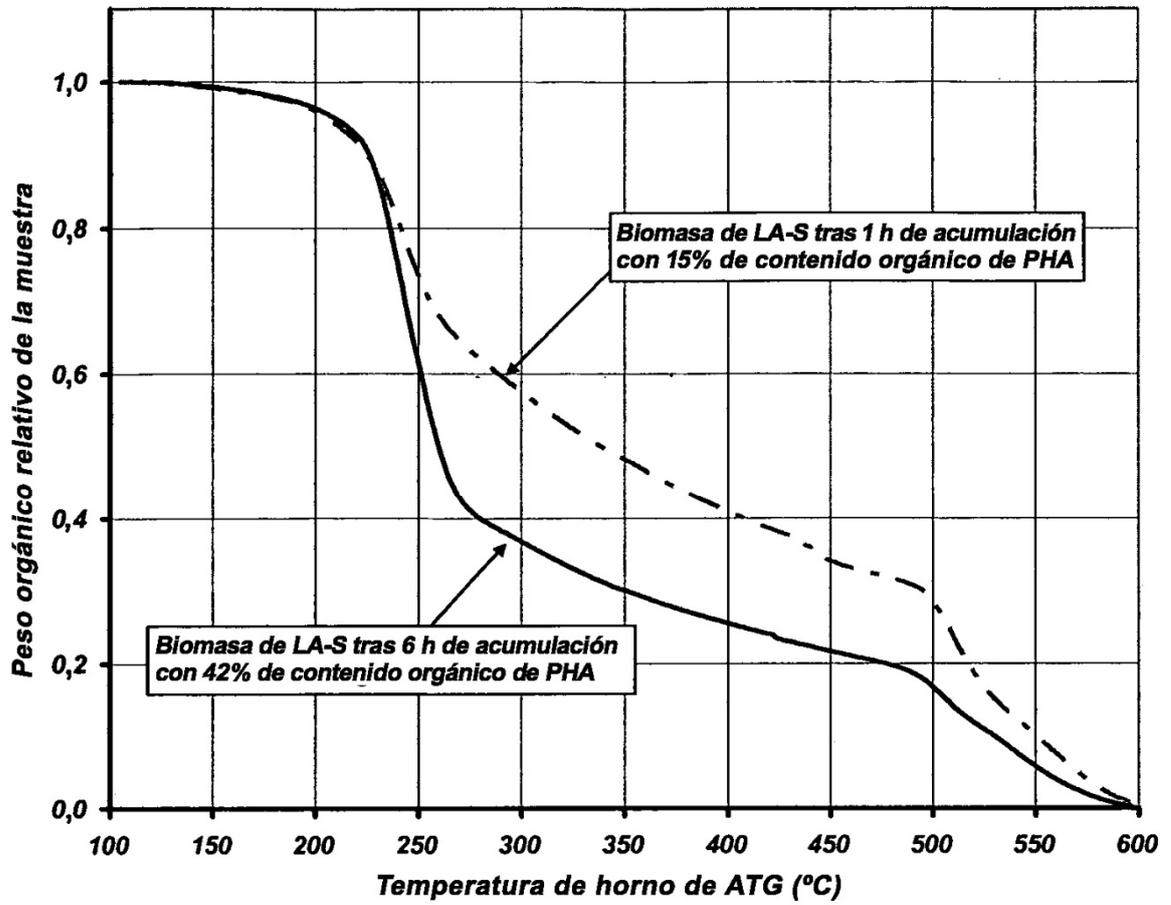


Figura 3

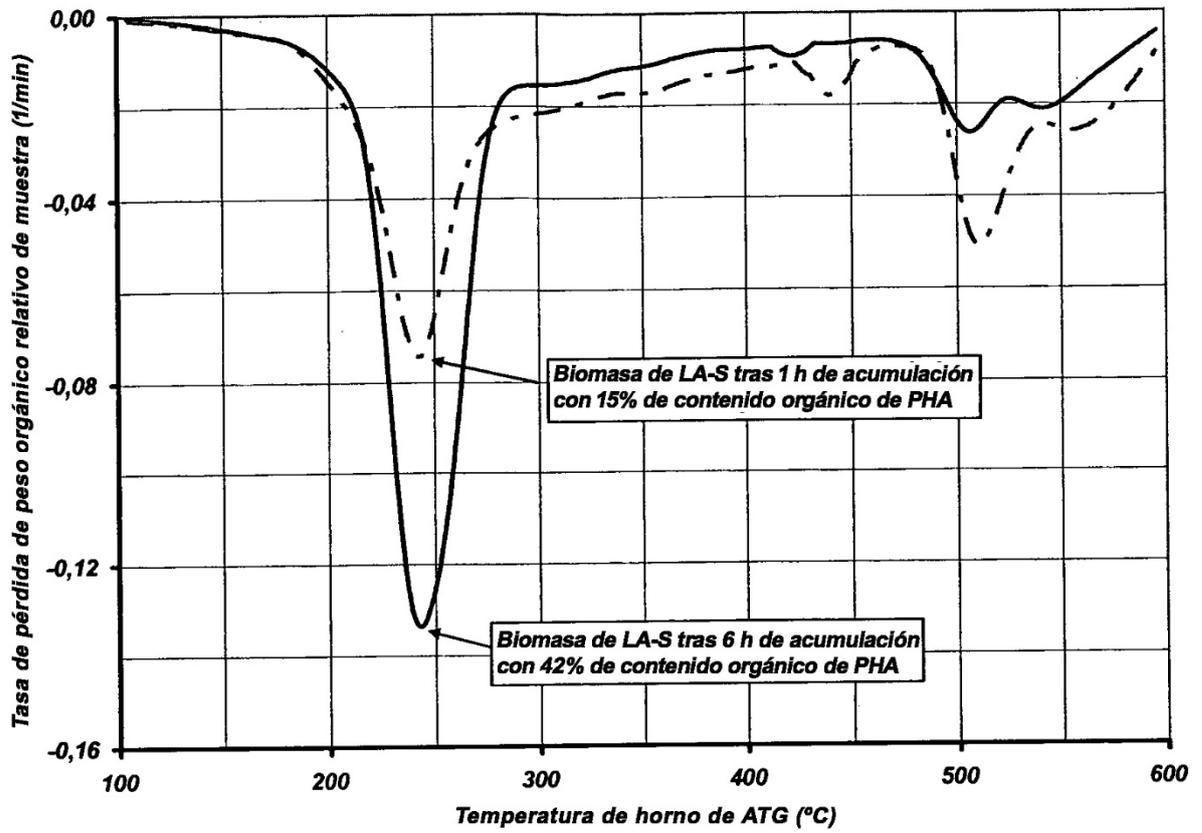


Figura 4

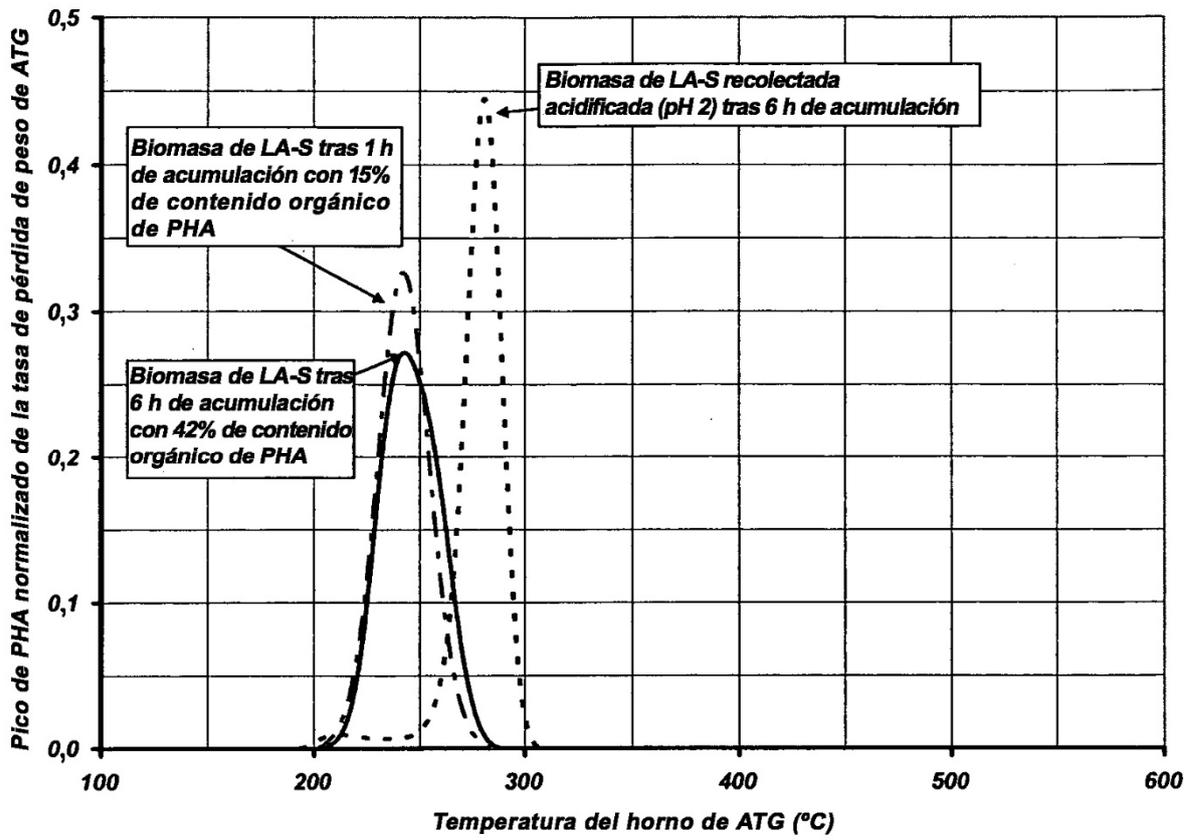


Figura 5

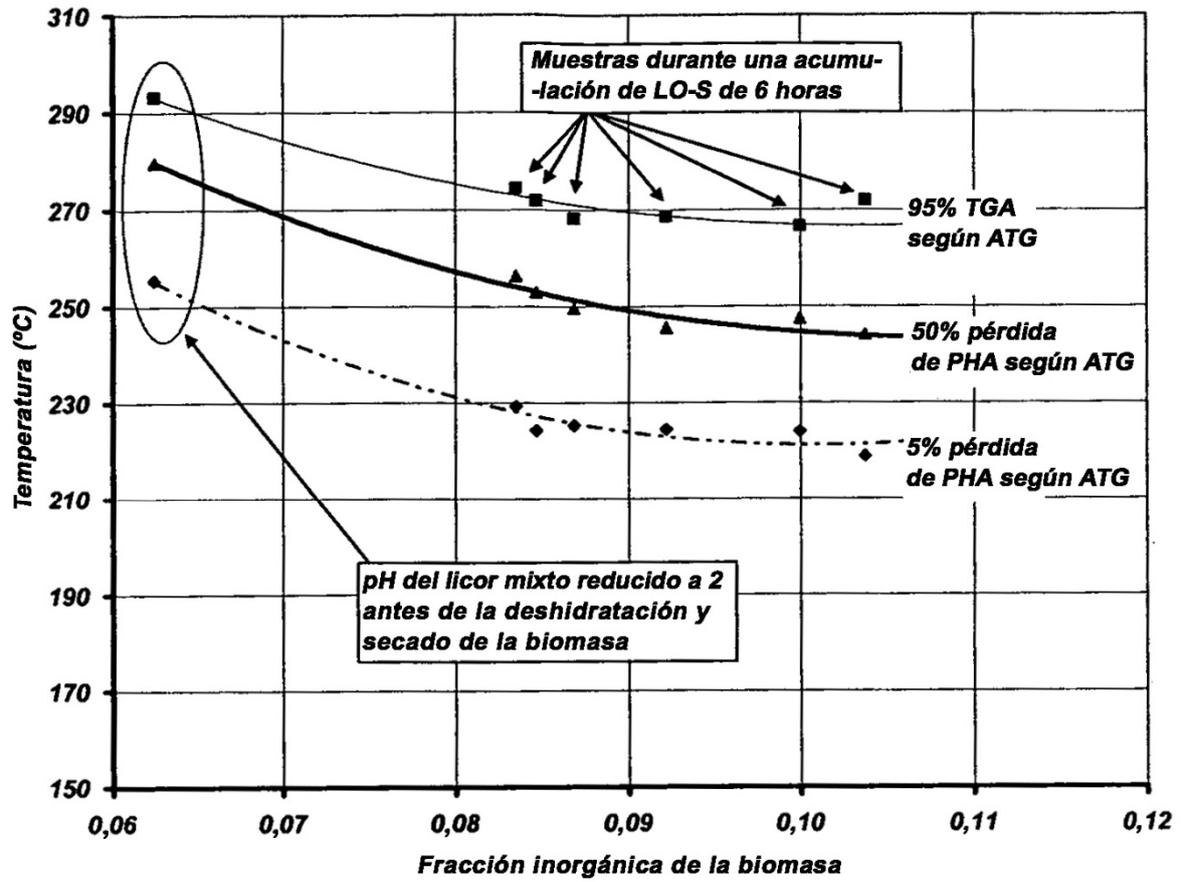


Figura 6

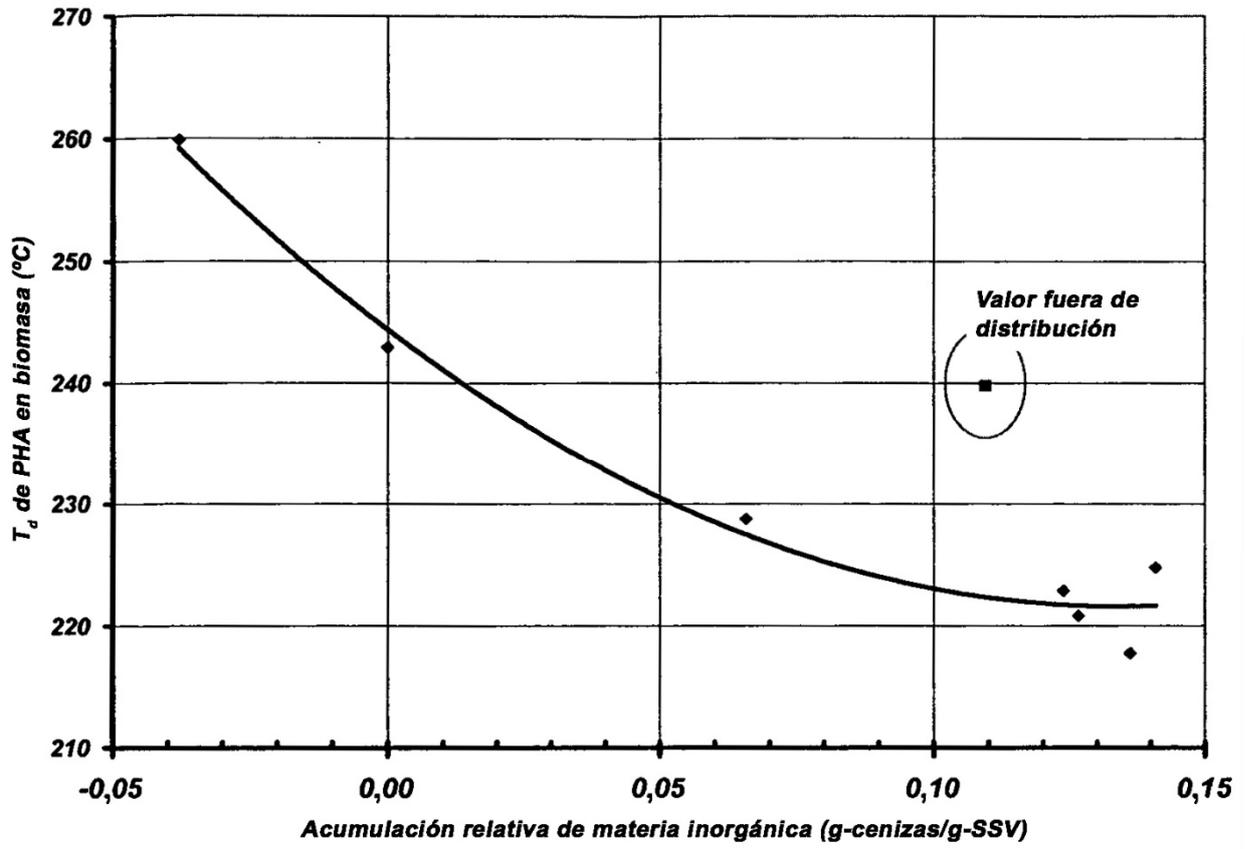


Figura 7

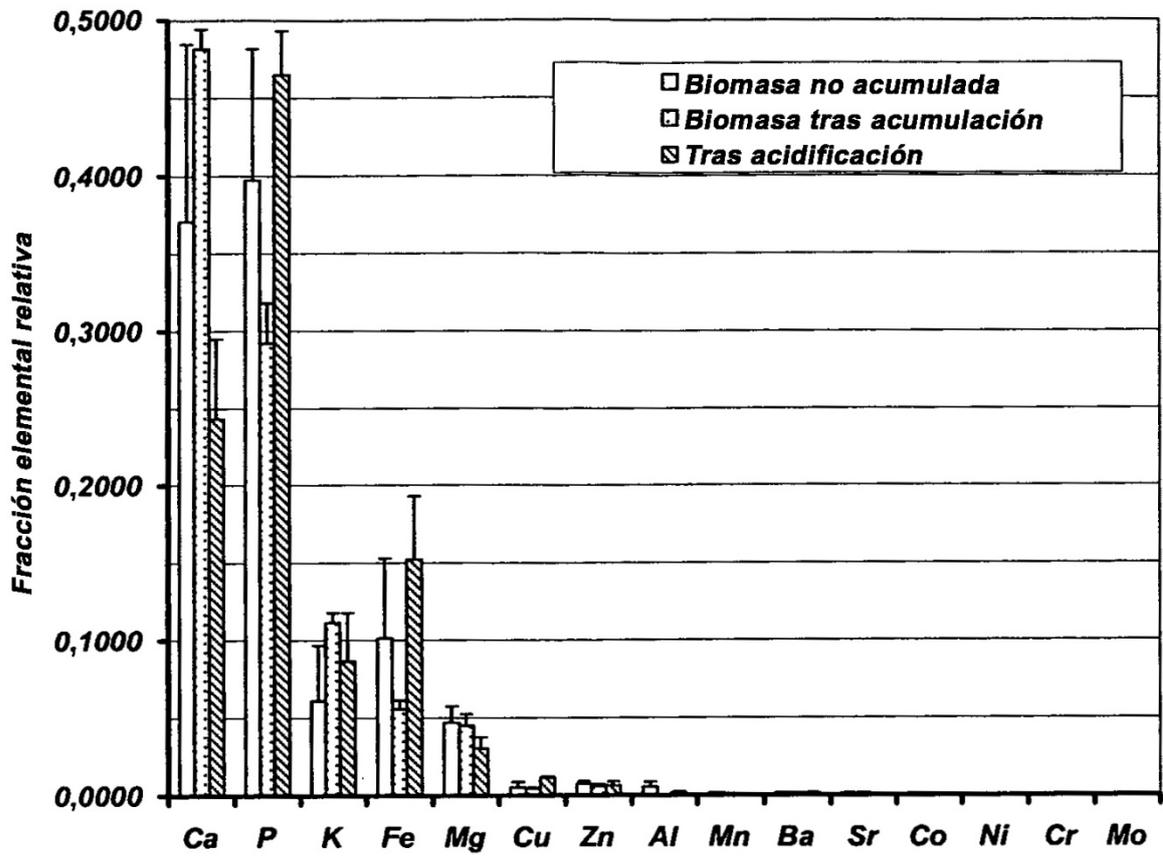


Figura 8

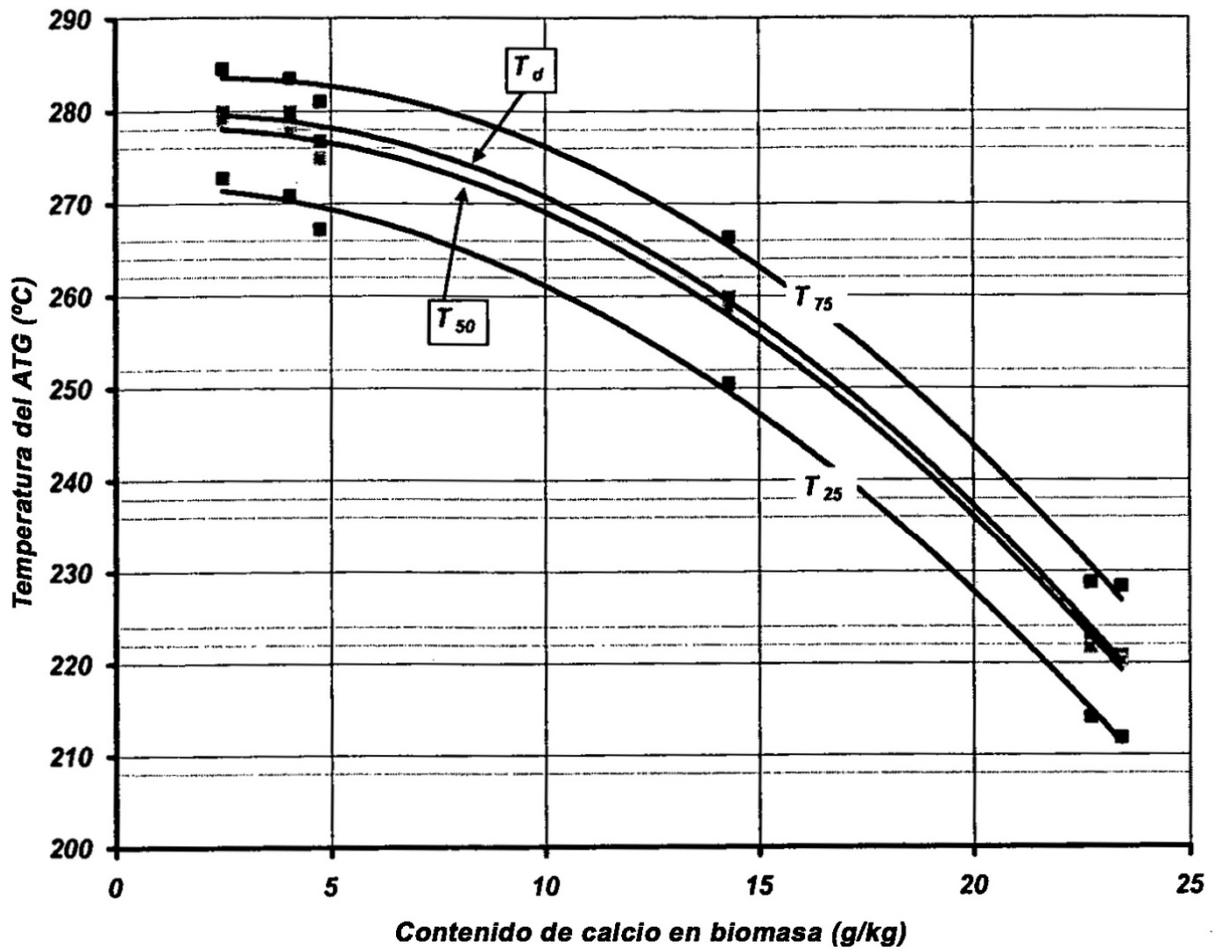


Figura 9

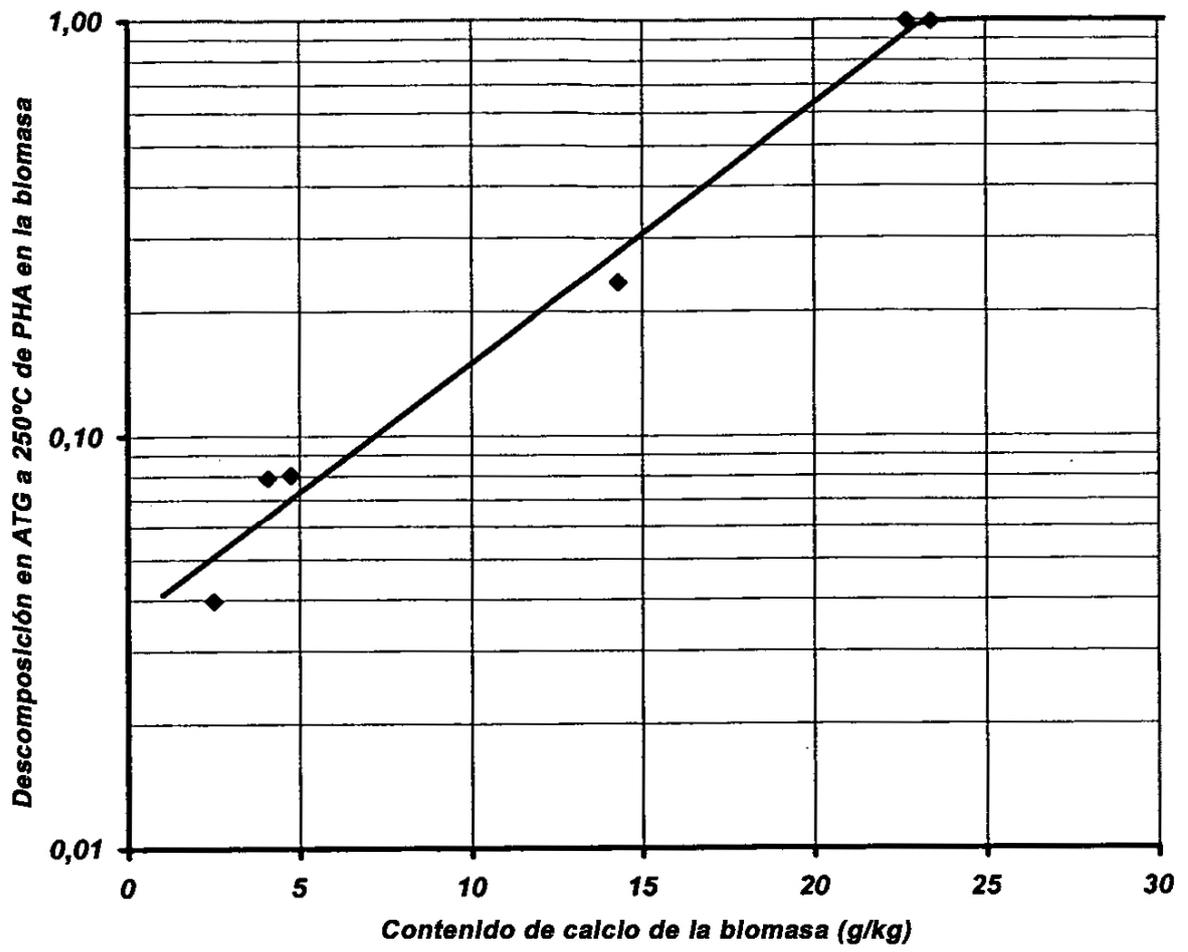


Figura 10

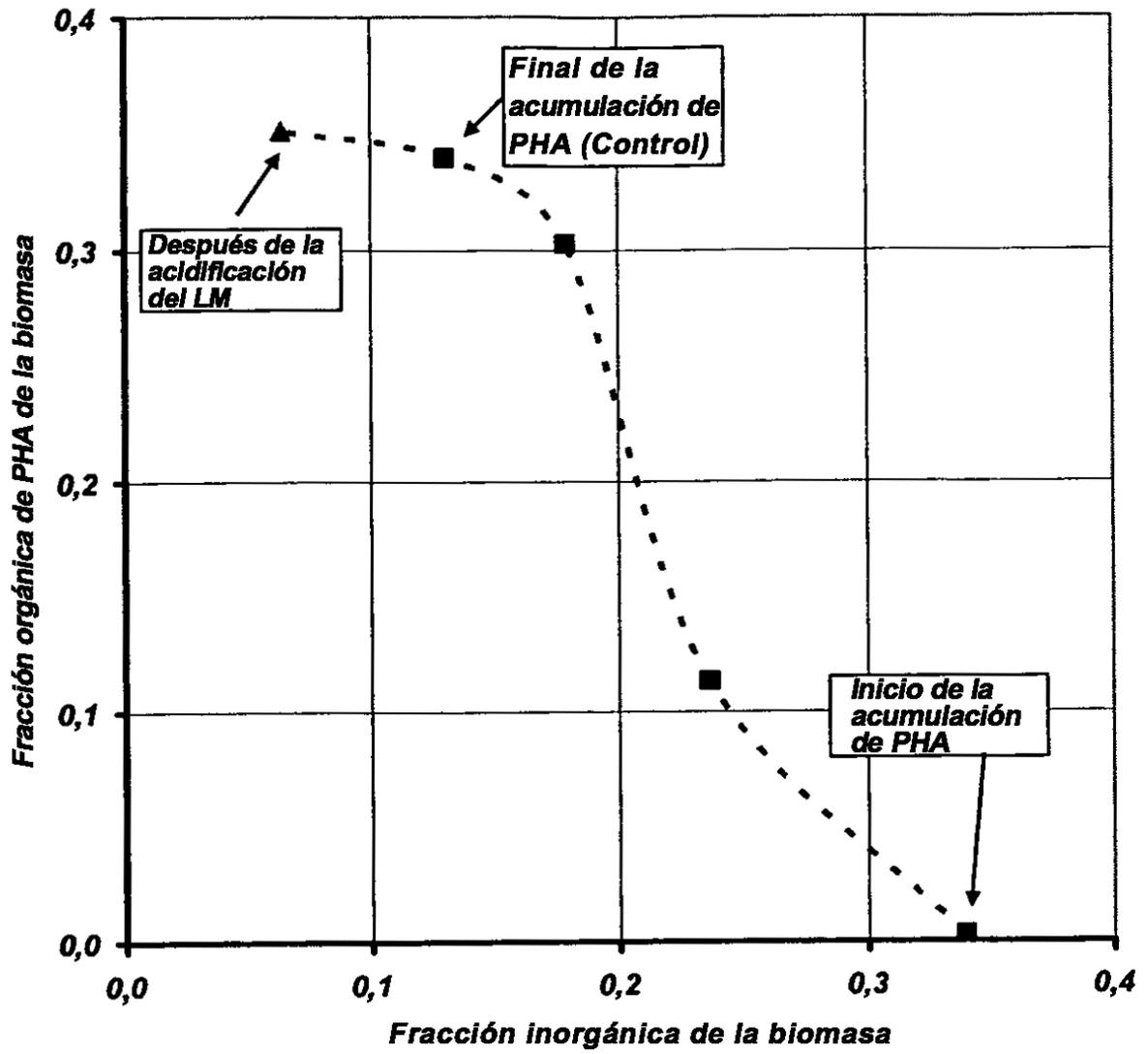


Figura 11

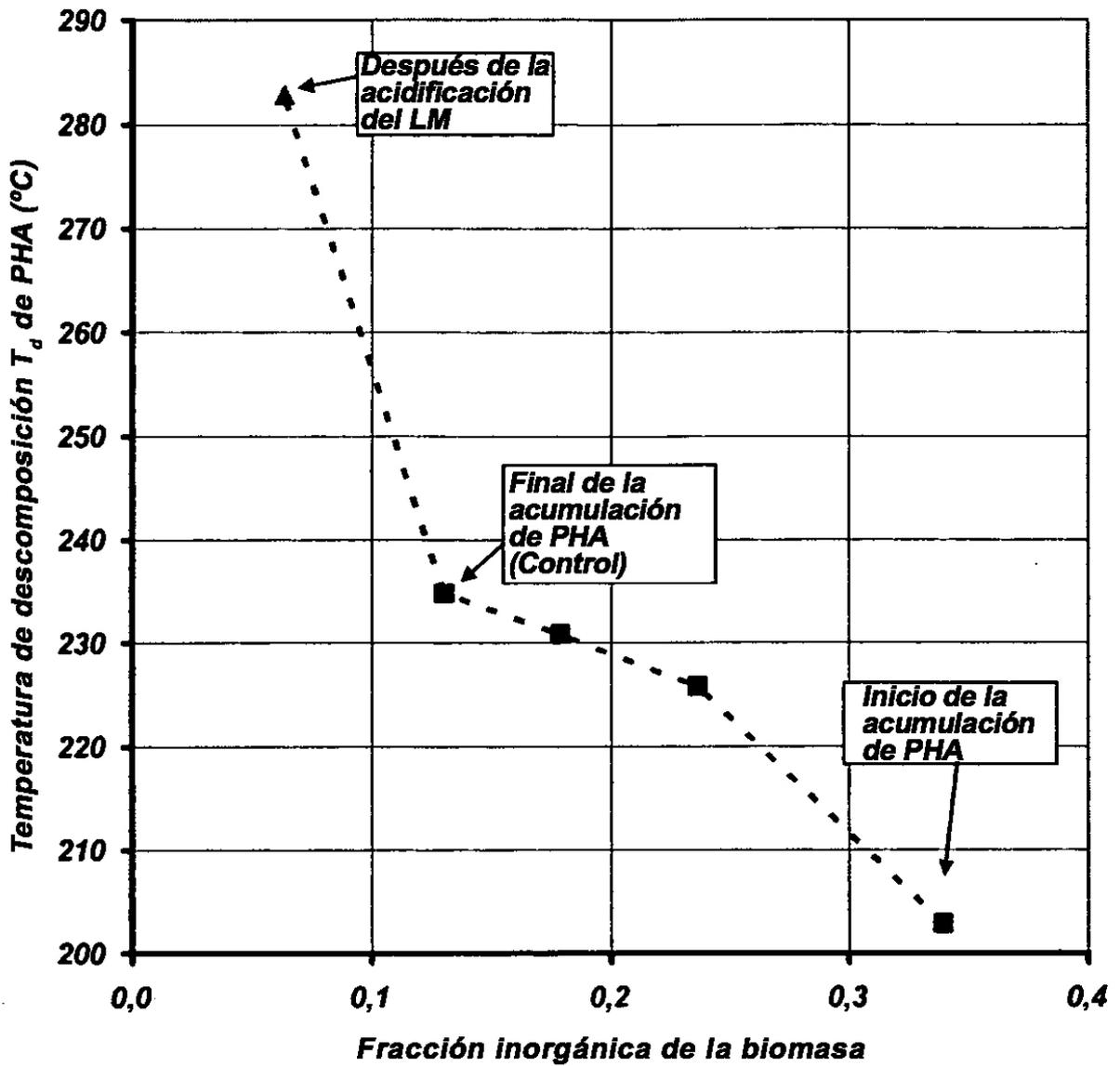


Figura 12

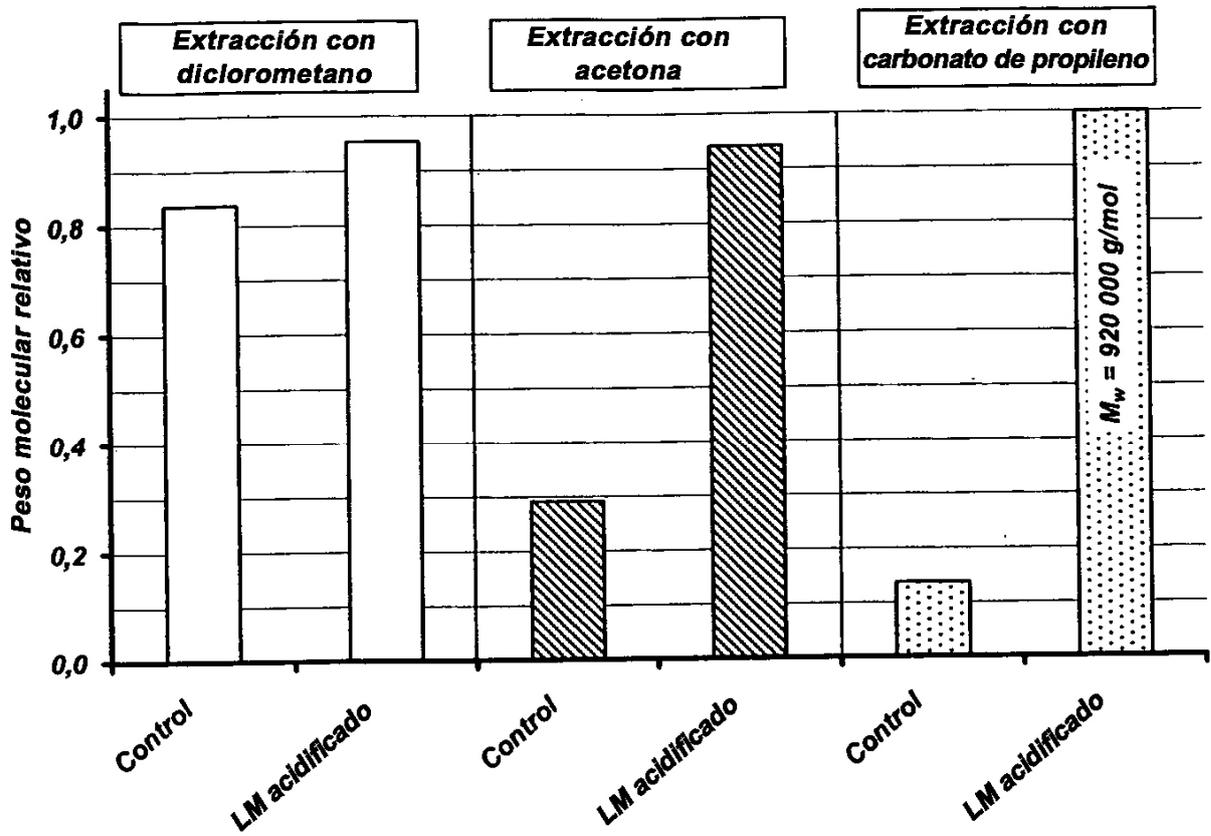


Figura 13

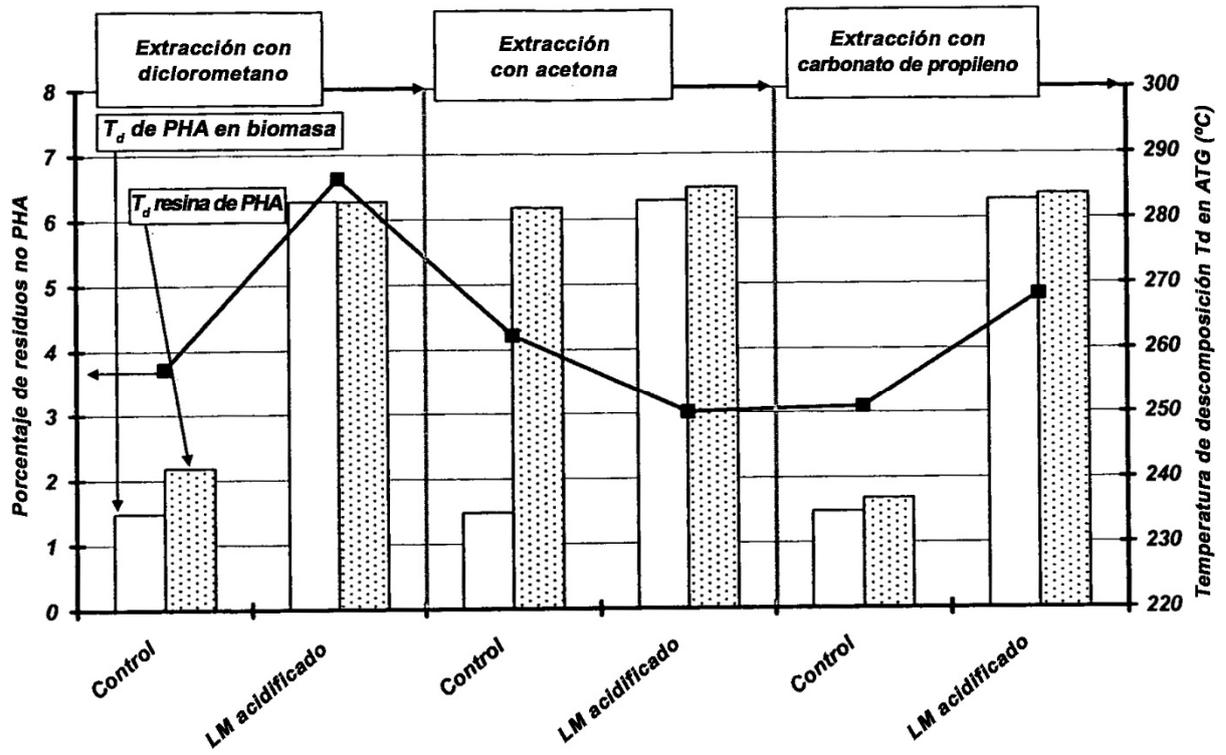


Figura 14

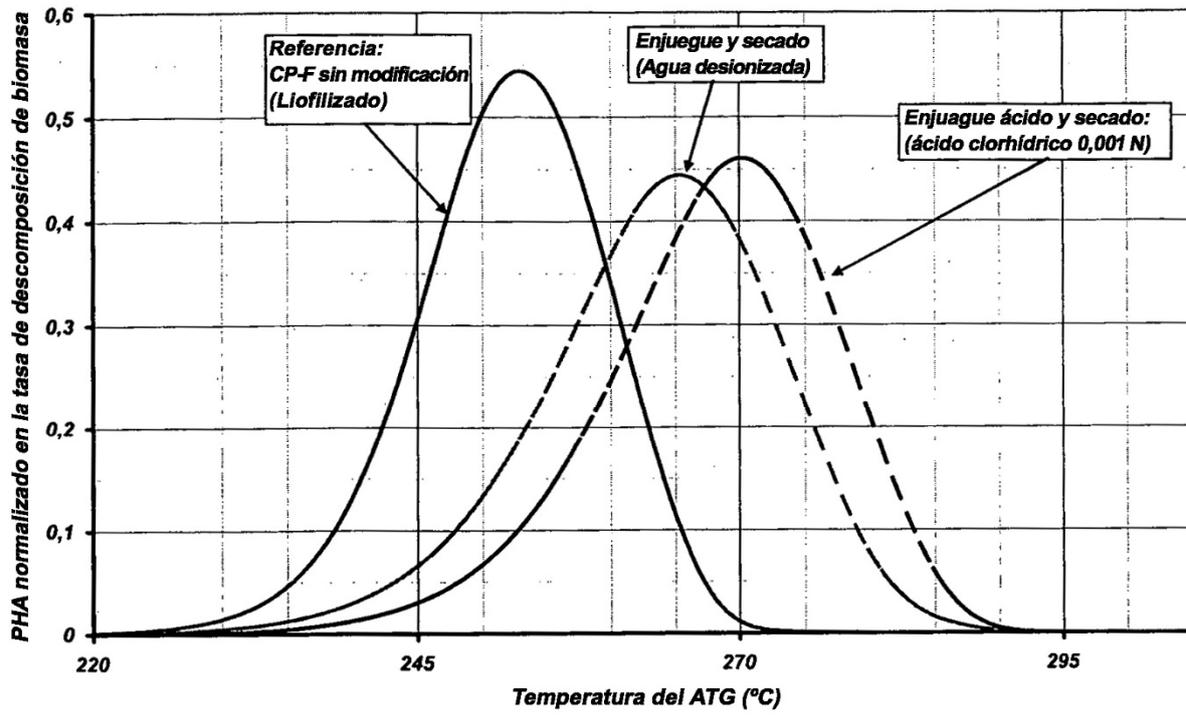


Figura 15

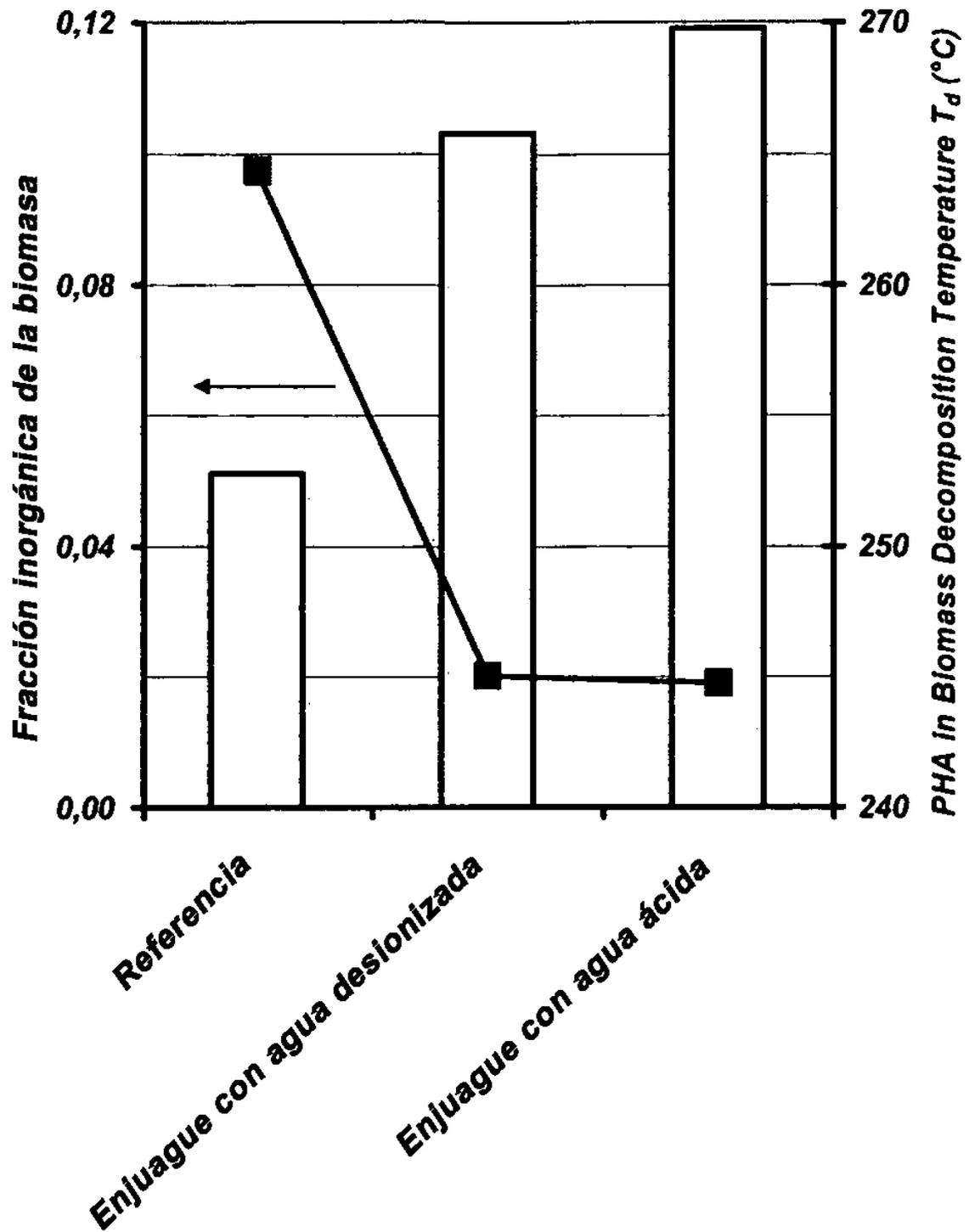


Figura 16

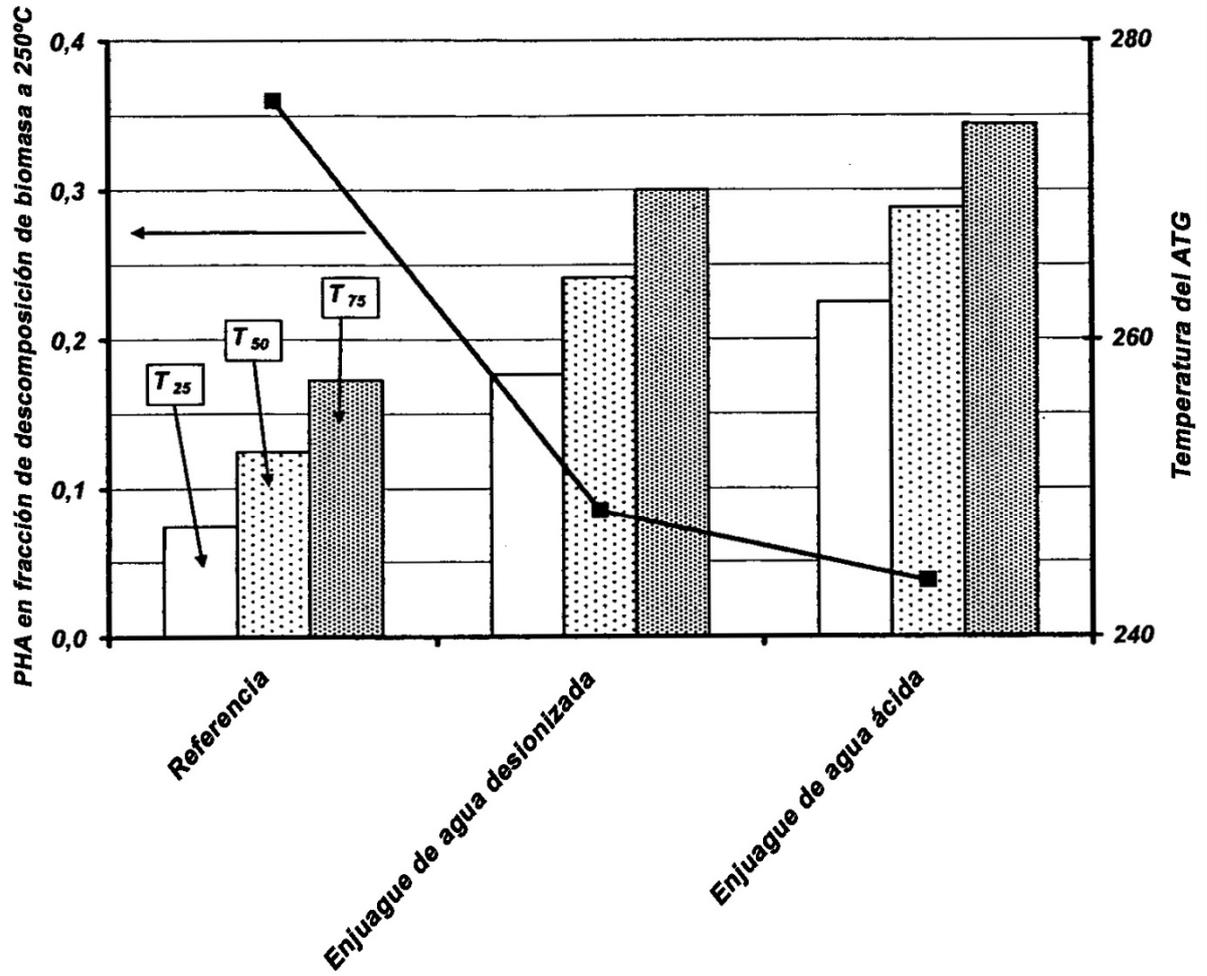


Figura 17

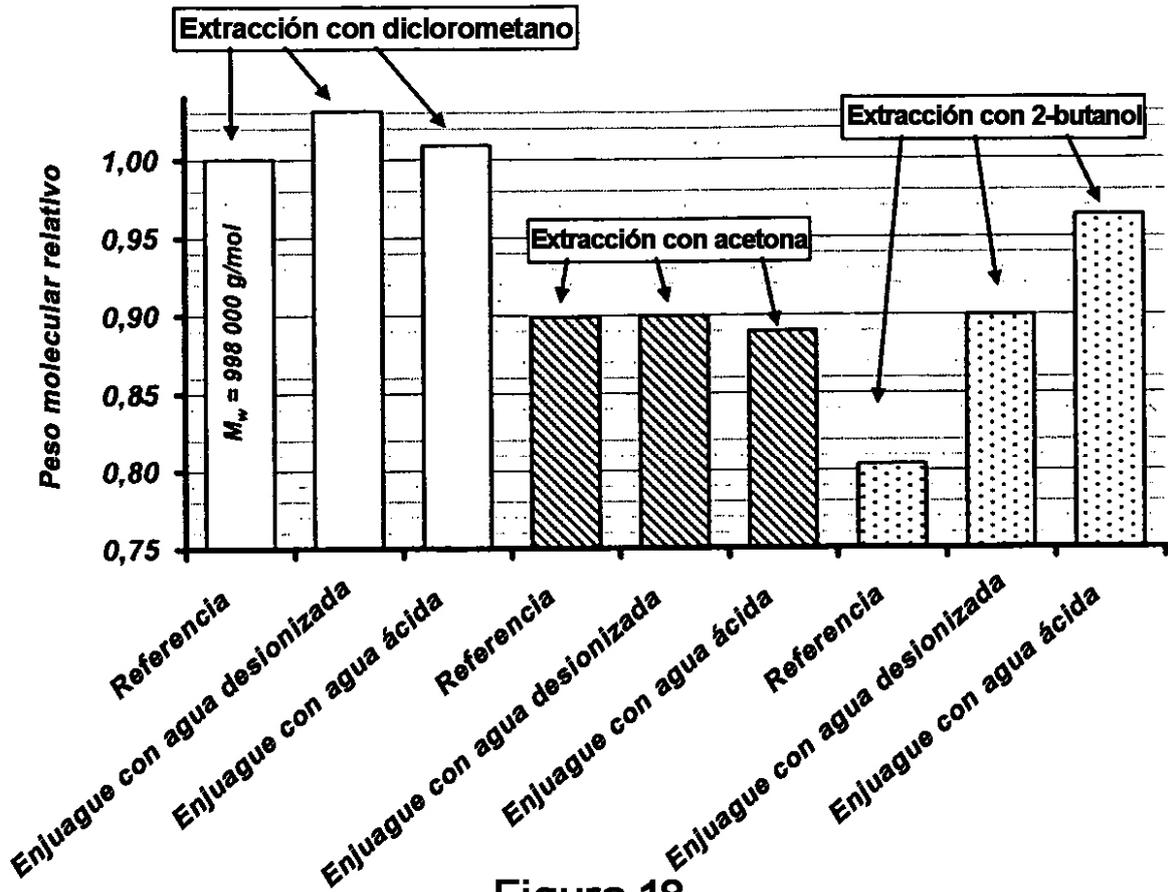


Figura 18

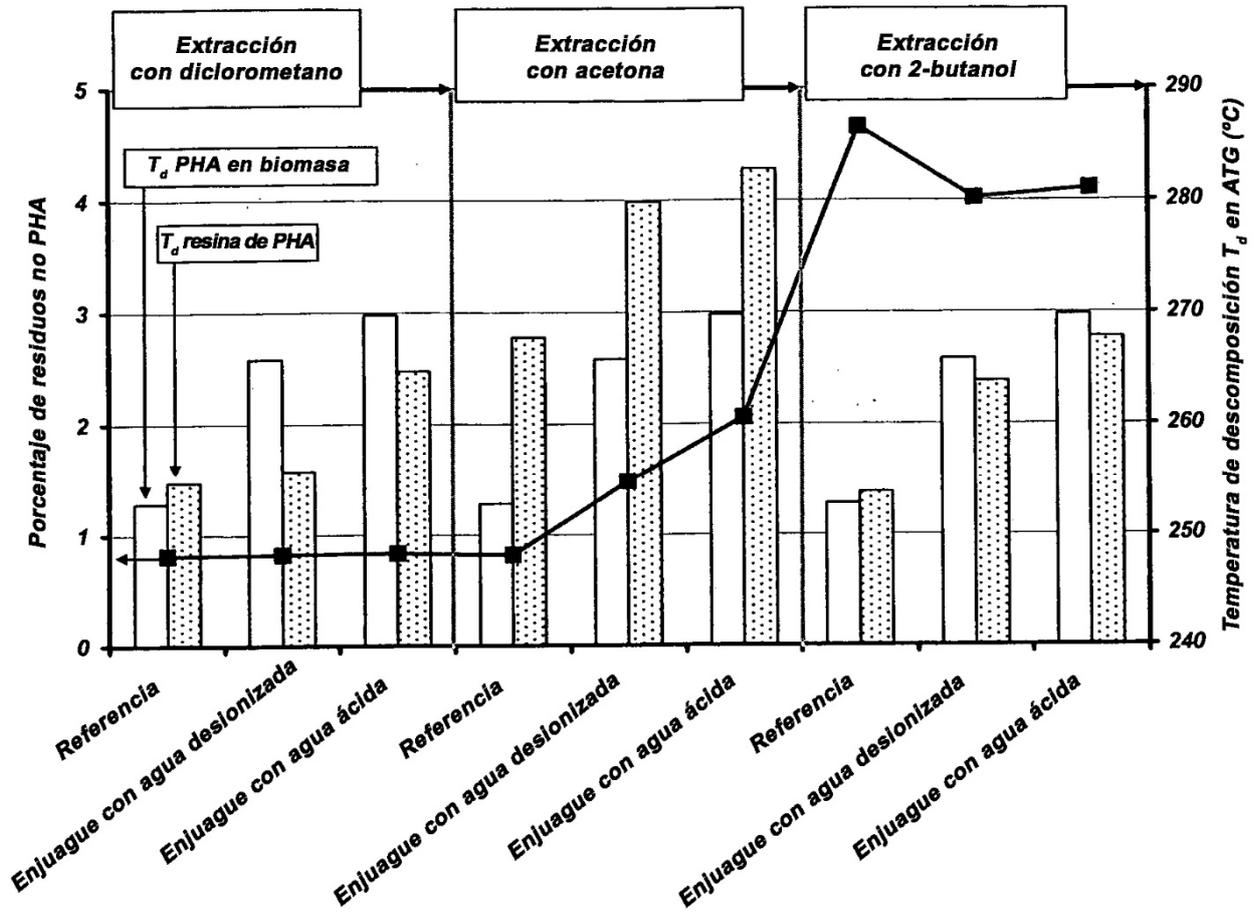


Figura 19

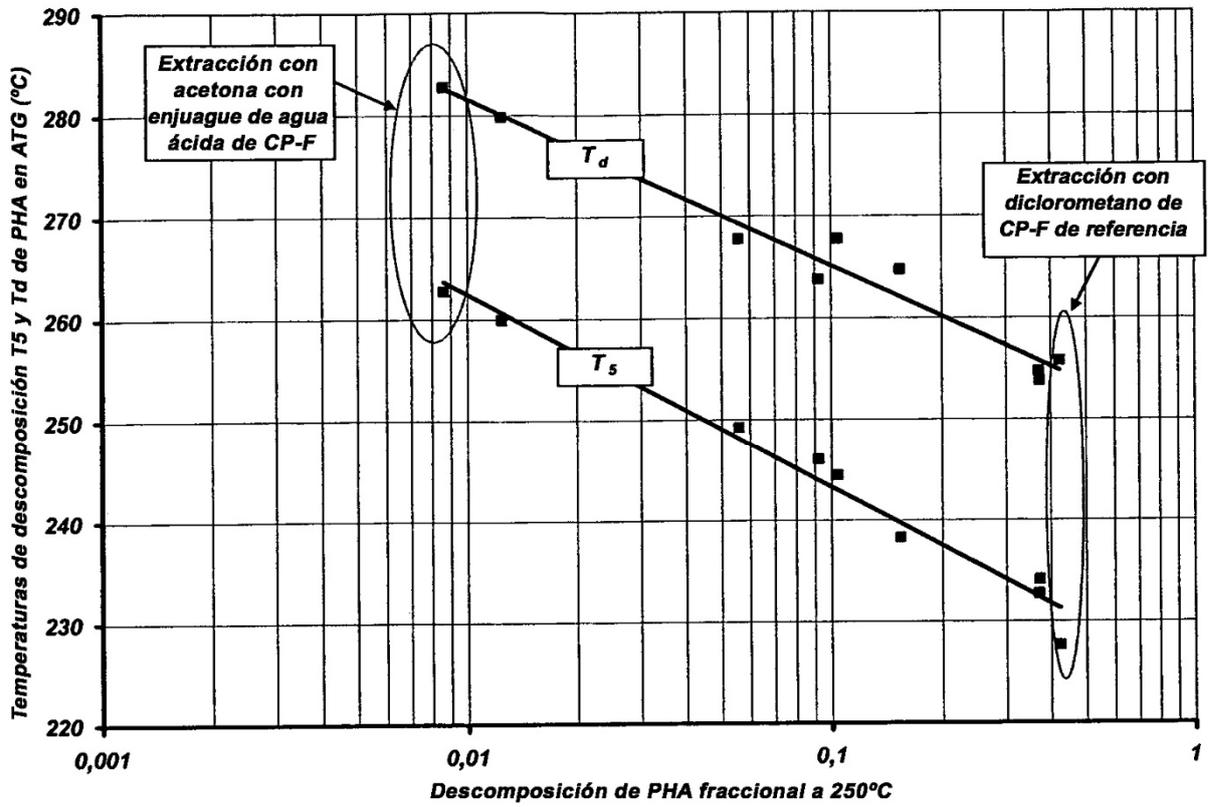


Figura 20

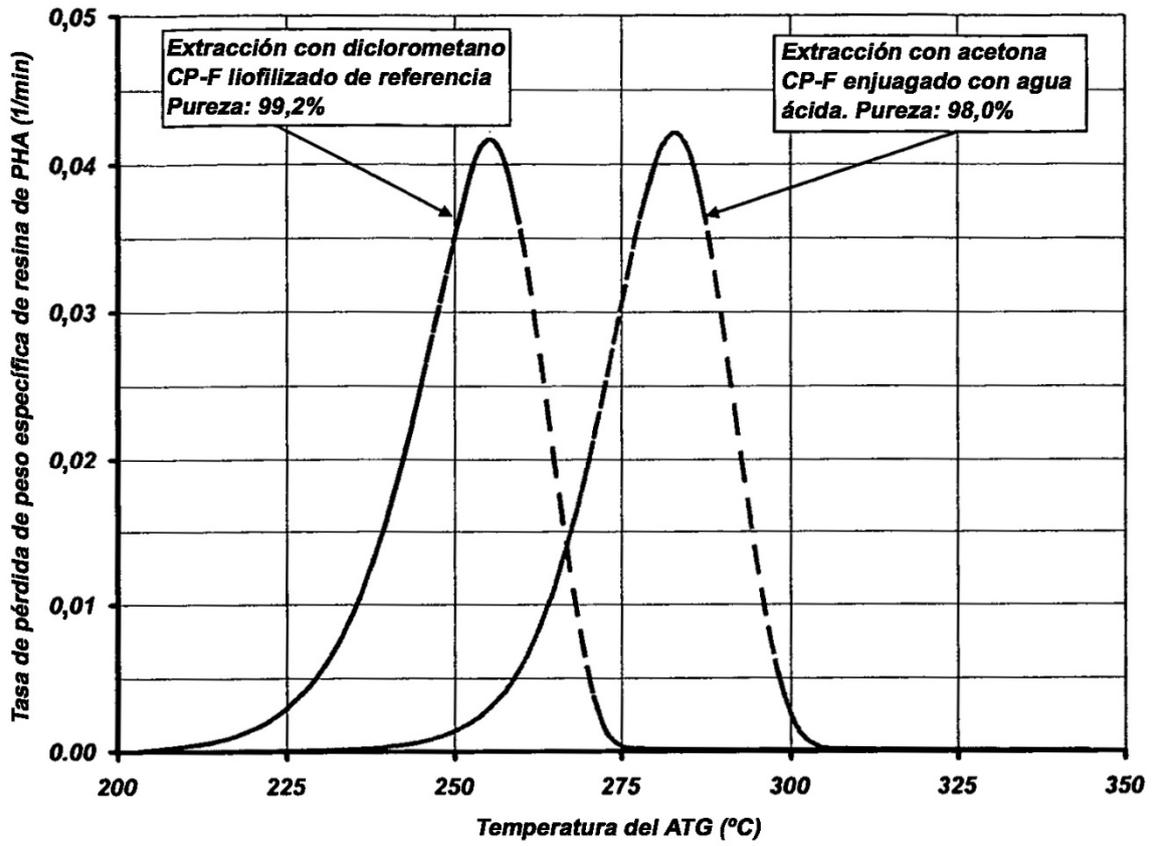


Figura 21

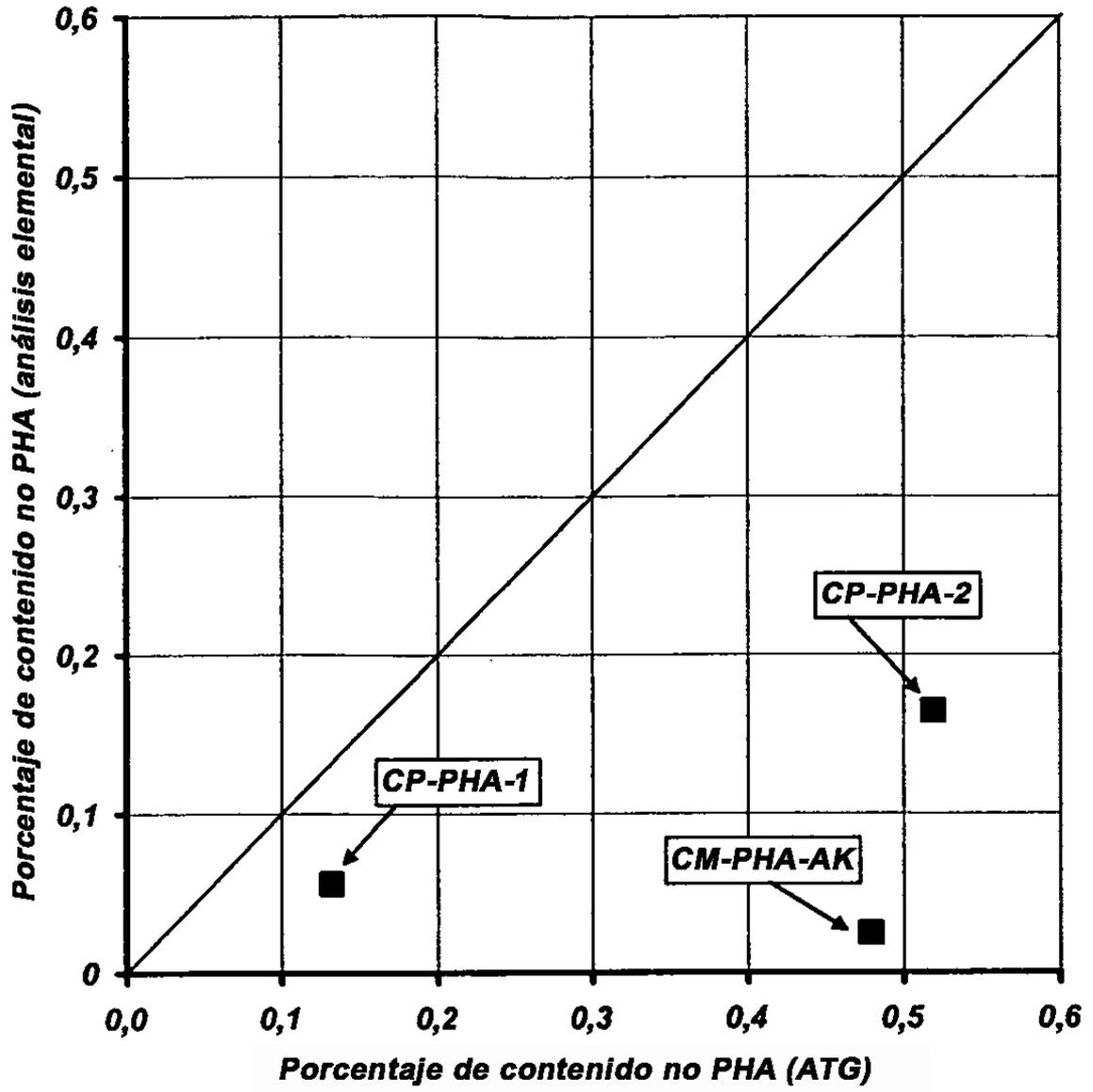


Figura 22

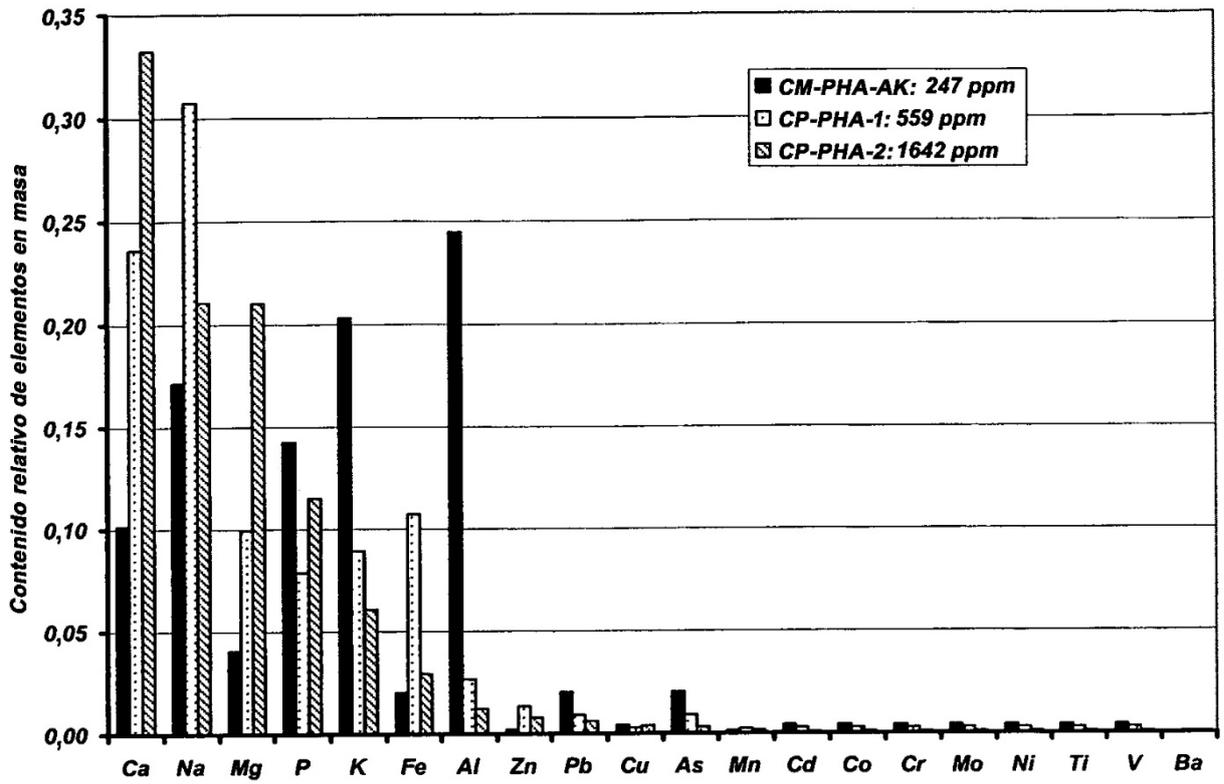


Figura 23

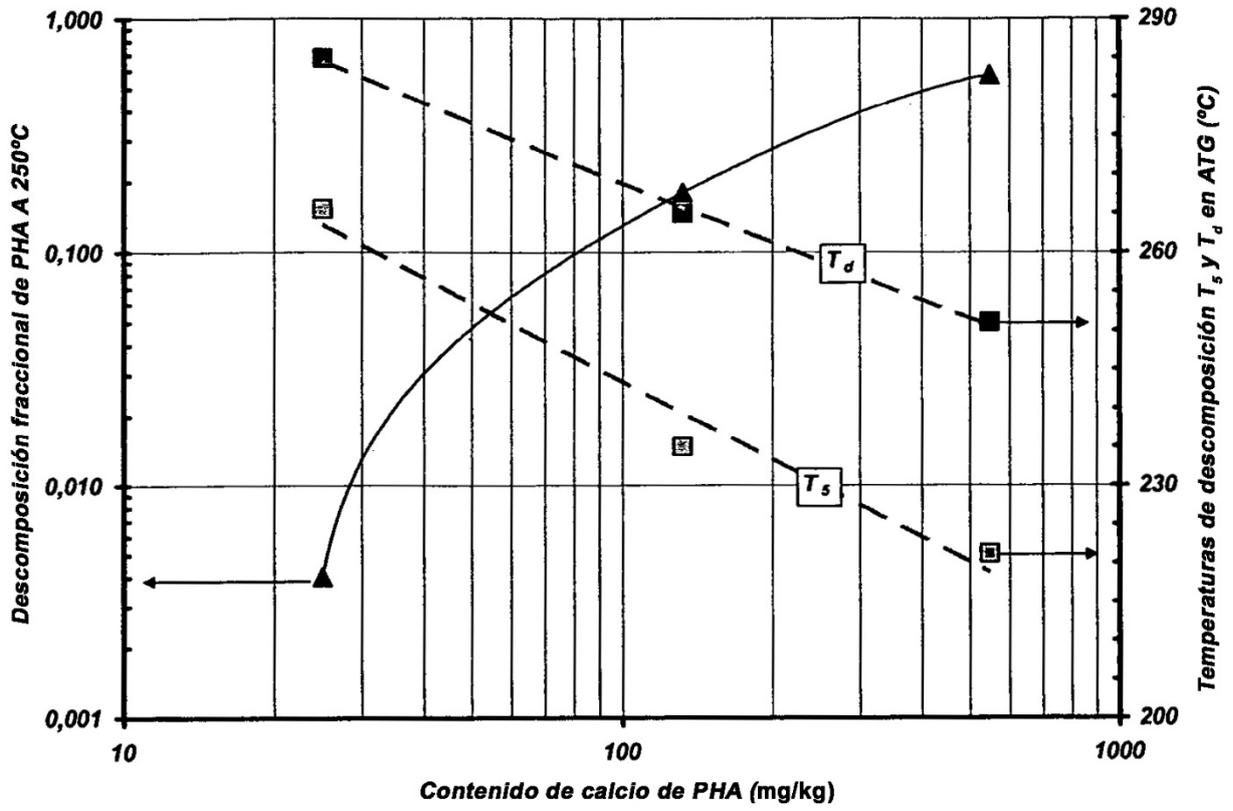


Figura 24

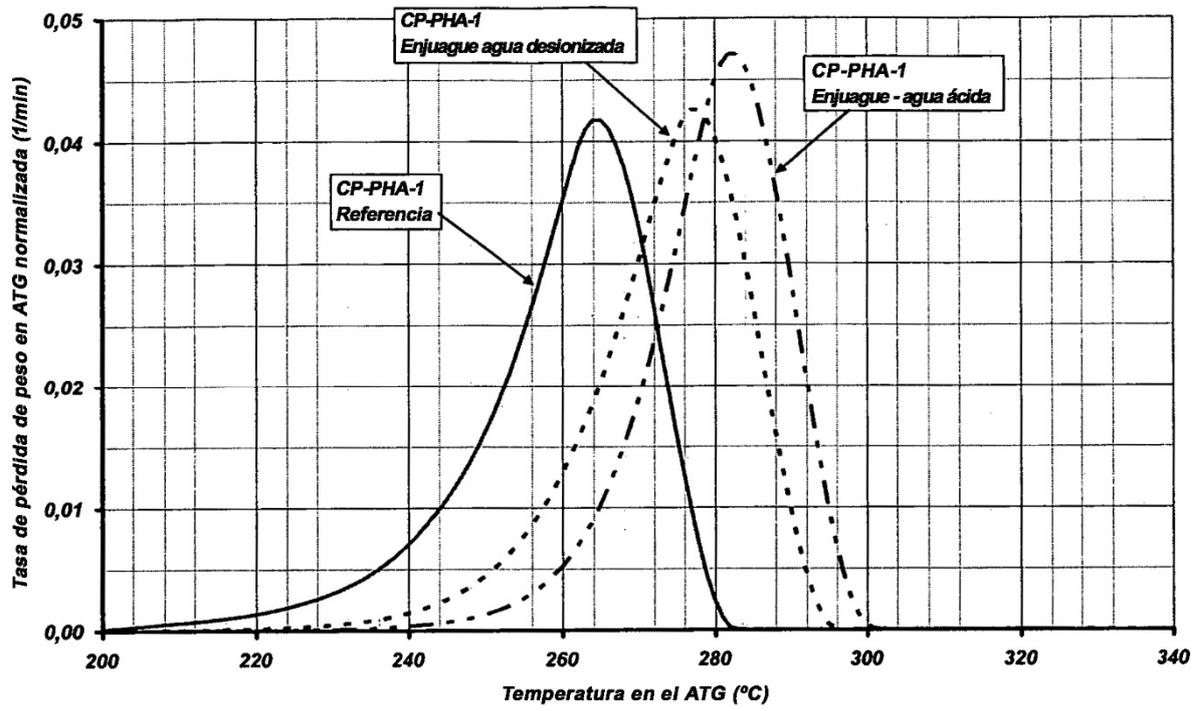


Figura 25

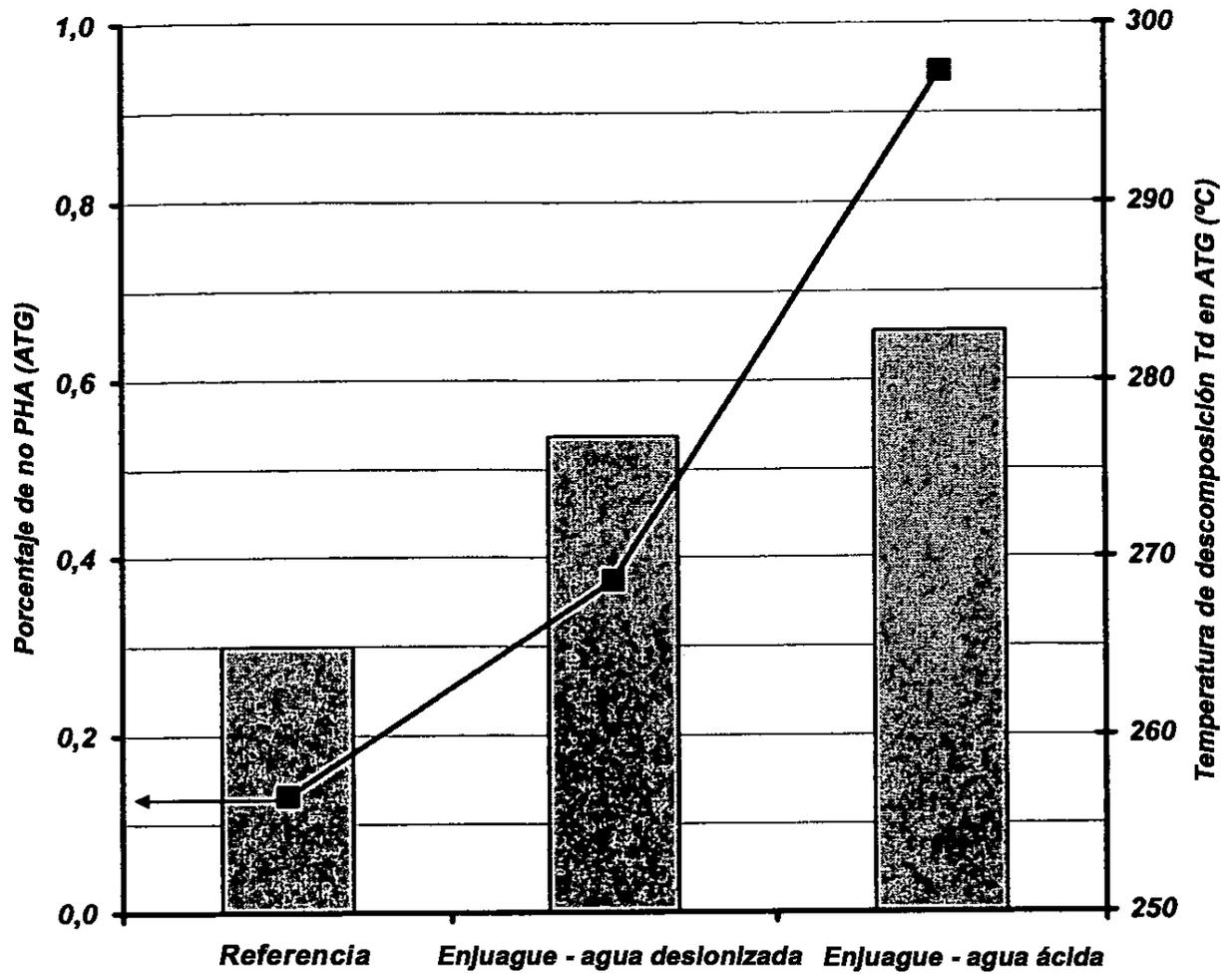


Figura 26

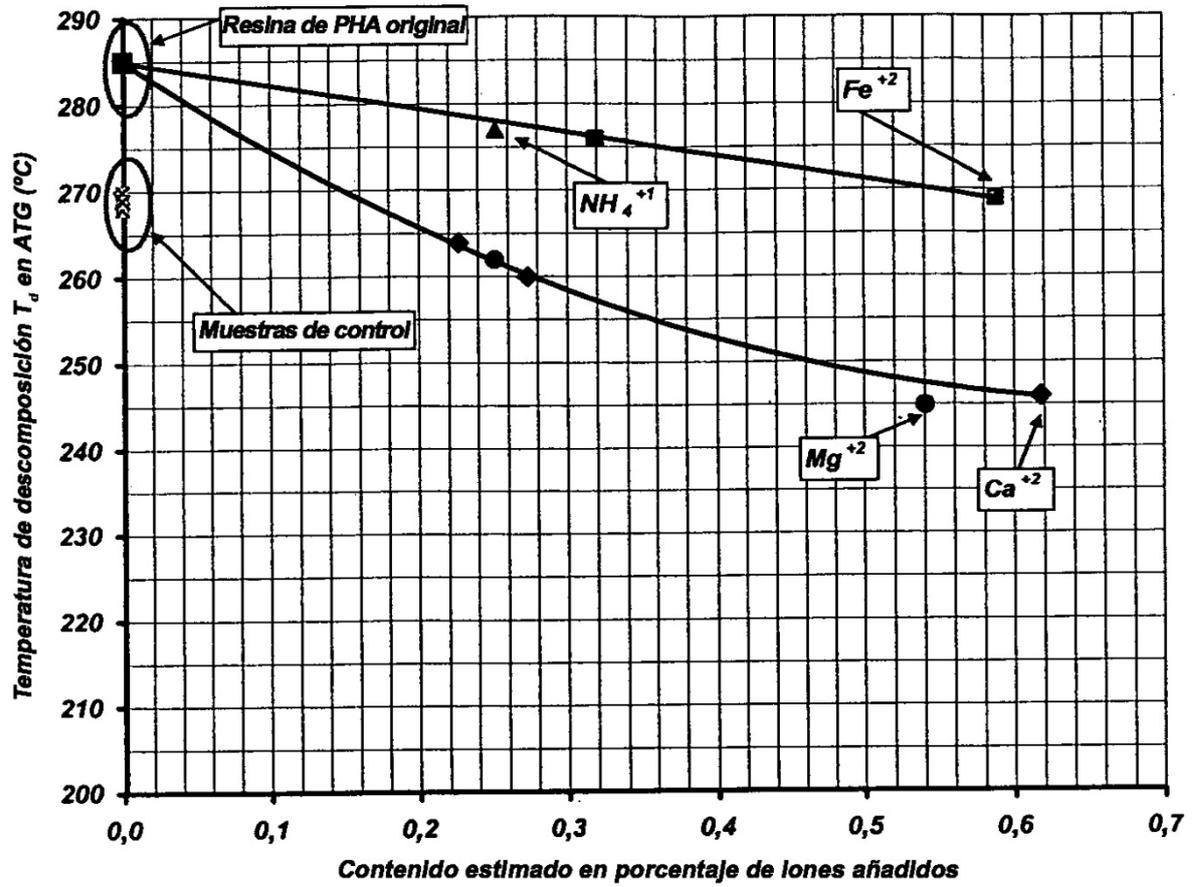


Figura 27

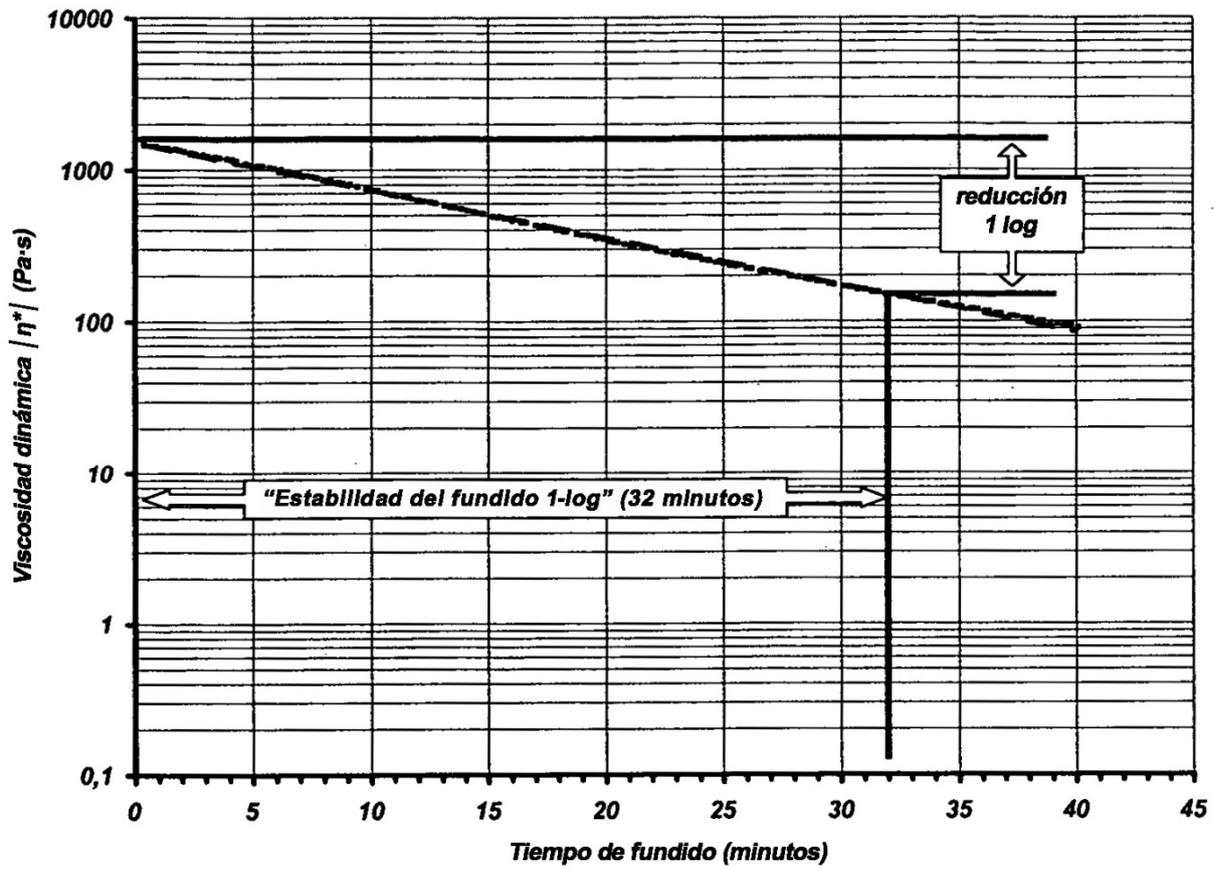


Figura 28

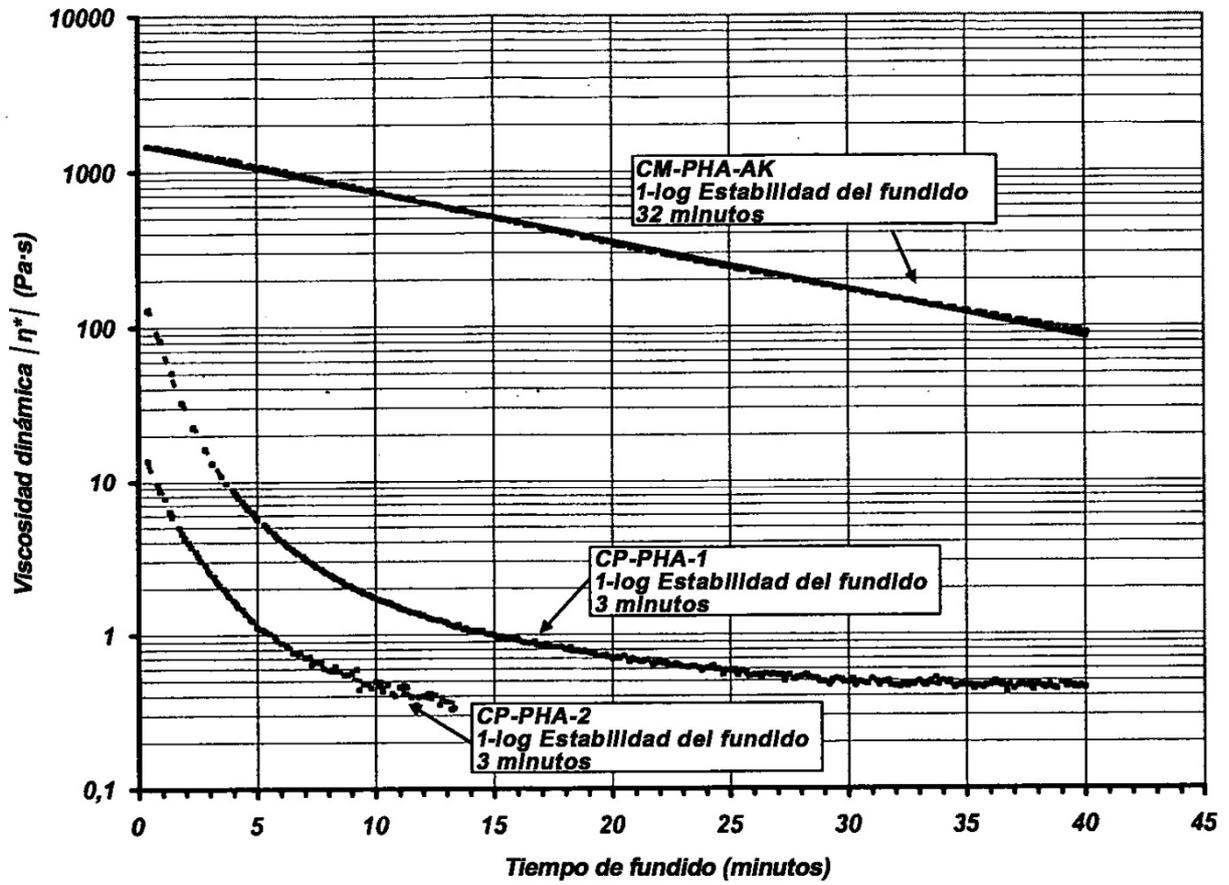


Figura 29

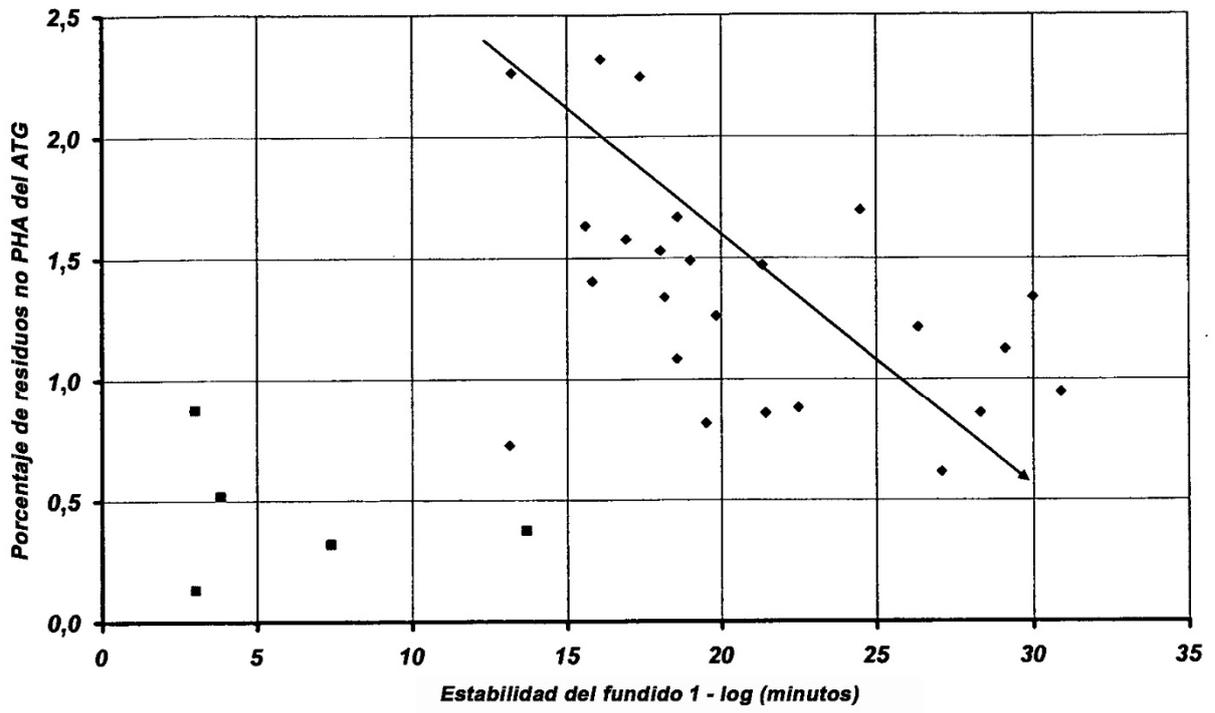


Figura 30

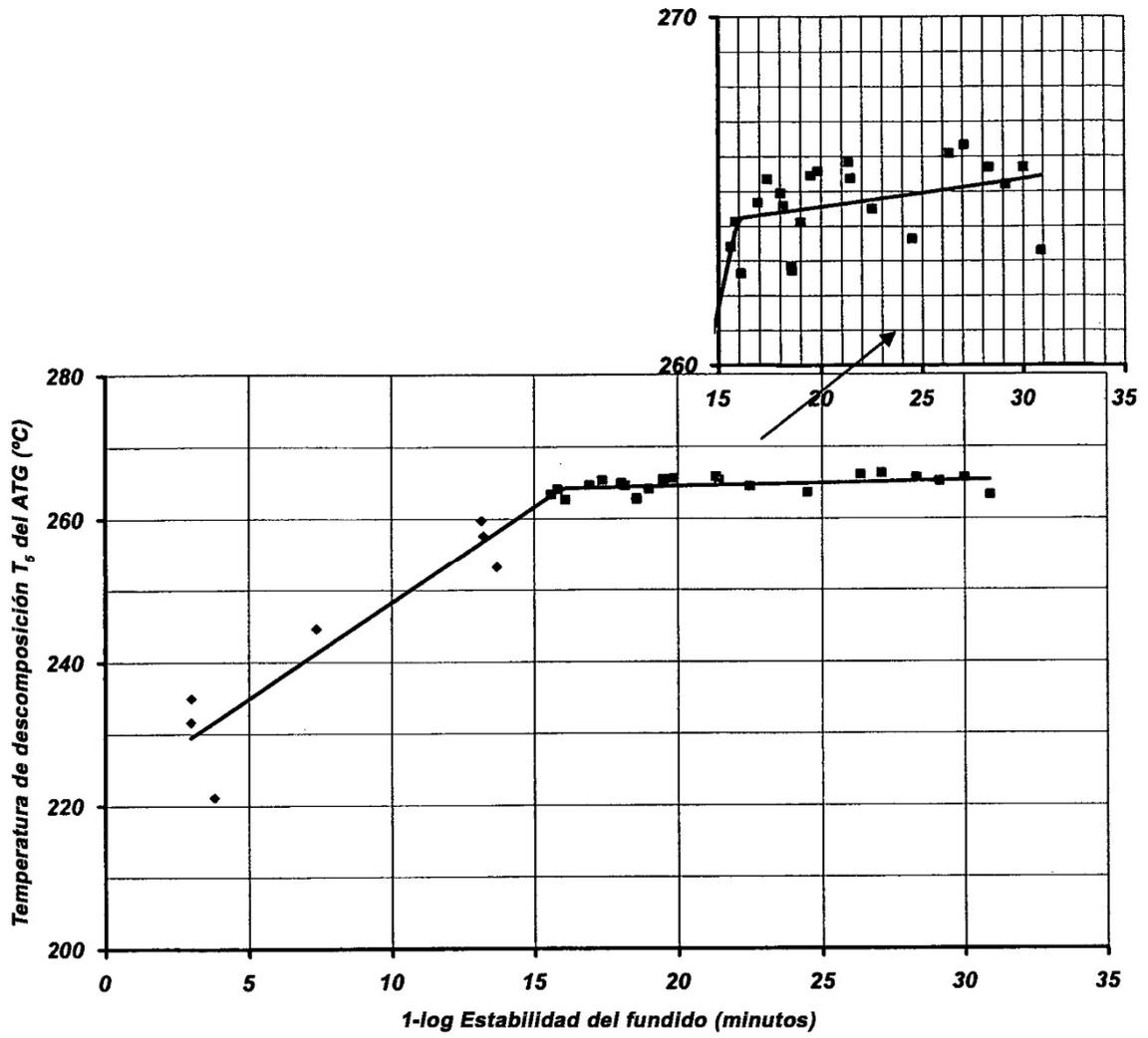


Figura 31

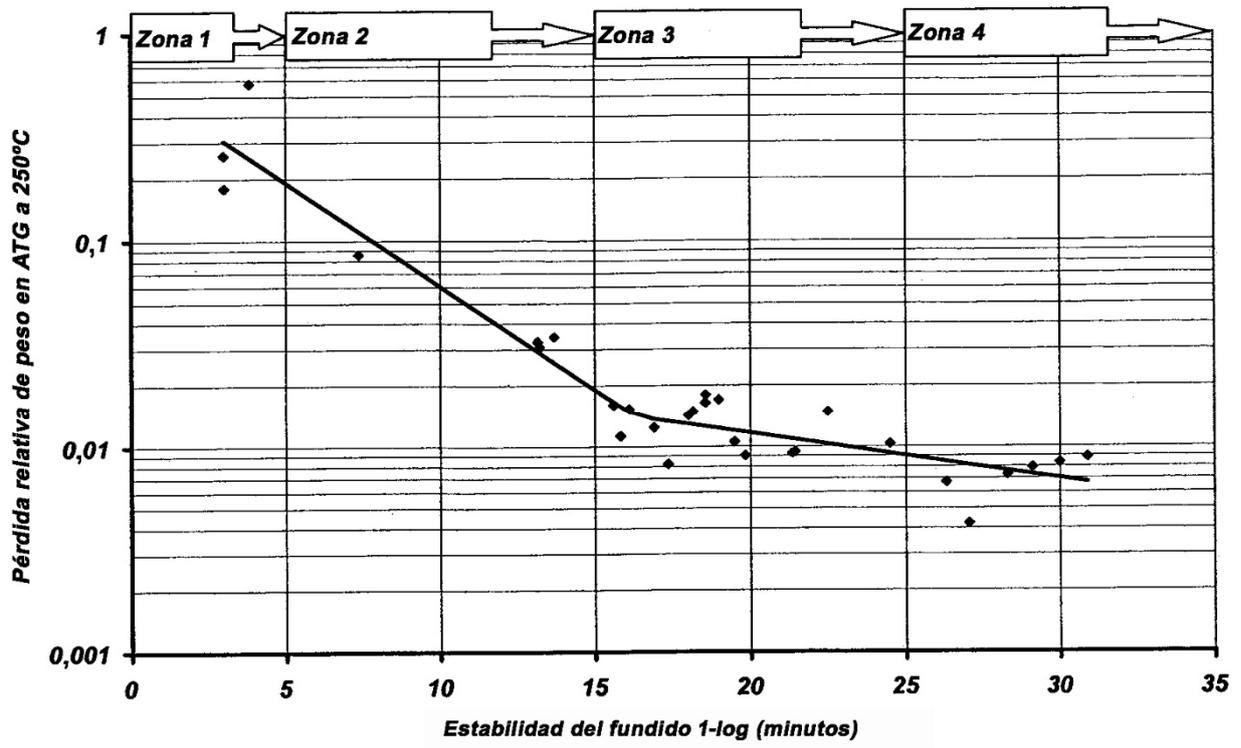


Figura 32