

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 707 304**

51 Int. Cl.:

C08J 11/10 (2006.01)

C12P 7/44 (2006.01)

C08L 67/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.11.2013 PCT/EP2013/074173**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.05.2014 WO14079844**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.11.2013 E 13795210 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.10.2018 EP 2922906**

54 Título: **Método para reciclar productos de plástico**

30 Prioridad:

20.11.2012 EP 12306442

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

03.04.2019

73 Titular/es:

**CARBIOS (100.0%)
Rue Emile Duclaux Biopôle Clermont-Limagne
63360 Saint-Beauzire, FR**

72 Inventor/es:

**BOISART, CÉDRIC y
MAILLE, EMMANUEL**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 707 304 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 para reciclar productos de plástico

5 La presente descripción se refiere a un método para reciclar productos de plástico, tales como plásticos de desecho. Más particularmente, la descripción se refiere a un método biológico para despolimerizar al menos un polímero de un producto de plástico y recuperar los monómeros resultantes para reprocesarlos adicionalmente con el fin de sintetizar nuevos polímeros y fabricar nuevos productos de plástico.

Contexto de la invención

10 Los plásticos son materiales baratos y duraderos que se pueden usar para fabricar una serie de productos que se pueden utilizar en una amplia gama de aplicaciones, por lo que la producción de plásticos ha aumentado espectacularmente a lo largo de las últimas décadas. Aproximadamente el 40 % de estos plásticos se usan para aplicaciones desechables de un solo uso, tales como envases, láminas agrícolas, bienes de consumo desechables o para productos de vida corta que se desechan en el plazo de un año desde su fabricación. Debido a la durabilidad de los polímeros implicados, se amontonan cantidades sustanciales de plásticos en los vertederos y hábitats naturales a escala mundial, lo que genera cada vez más problemas medioambientales. Incluso los plásticos degradables y biodegradables pueden perdurar durante décadas en función de factores medioambientales locales como los niveles de exposición a la luz ultravioleta, la temperatura, la presencia de microorganismos adecuados, etc.

20 Una solución para reducir los impactos medioambiental y económico correlacionados con la acumulación de plástico es el reciclamiento de circuito cerrado, en donde el material plástico se reprocesa mecánicamente para fabricar nuevos productos. Por ejemplo, uno de los reciclamientos de circuito cerrado más habituales es el reciclamiento de tereftalato de polietileno (PET). Los desechos de PET se someten a tratamientos sucesivos que conducen a PET reciclado homologado para contacto alimentario (rPET), que se recoge, clasifica, prensa en balas, tritura, lava, pica para producir escamas, funde y extruye en pelets y se pone a la venta. A continuación, estos PET reciclados se pueden usar para producir tejidos para la industria textil o envases nuevos tales como botellas o envases blíster, etc.

25 Sin embargo, los desechos plásticos generalmente se recogen todos juntos, por lo que las balas de plástico contienen una mezcla de diferentes plásticos, cuya composición puede variar de fuente a fuente, y cuyas proporciones pueden variar de bala a bala. Por consiguiente, los procedimientos de reciclamiento requieren una selección preliminar para clasificar los productos de plástico según su composición, tamaño, tipo de resina, aditivos funcionales usados, etc.

30 Además, los procedimientos de reciclamiento de plástico actuales usan cantidades enormes de electricidad, especialmente durante la etapa de extrusión, y los equipos usados también son costosos, lo que conduce a precios elevados que pueden resultar no competitivos en comparación con el plástico virgen.

35 Otro procedimiento potencial para reciclar plástico consiste en el reciclamiento químico, que permite recuperar los constituyentes químicos del polímero. Los monómeros resultantes se pueden usar a continuación para volver a fabricar plástico o para fabricar otros productos químicos sintéticos. Sin embargo, hasta ahora, tal procedimiento de reciclamiento solo se ha realizado sobre polímeros purificados y no es eficaz sobre productos de plástico en bruto constituidos por una mezcla de polímeros cristalizados y amorfos y aditivos.

El documento JP2009039095 se refiere a cepas bacterianas y fúngicas útiles para descomponer poliéster, en donde los monómeros producidos son asimilables por dichas cepas.

40 Xiaoping Hu *et al.* (Applied Microbiology and Biotechnology, Springer, Berlín, Alemania, vol. 87, n.º 2, 15 de abril del 2010, páginas 771-779) describen un método de compostaje de poliésteres mediante el uso de bacterias que poseen la capacidad de degradar poliésteres.

Por tanto, existe necesidad de un procedimiento mejorado para reciclar productos de plástico que no requiera clasificación preliminar ni pretratamientos costosos y que se pueda usar para reciclar diferentes materiales plásticos.

Compendio de la invención

45 Ahora, los inventores describen un procedimiento biológico para despolimerizar al menos un polímero de al menos un producto de plástico con bajo consumo de energía. El procedimiento descrito permite recuperar los monómeros que integraban los polímeros originales de un producto de plástico, de forma que dichos monómeros pueden reprocesarse para sintetizar cadenas de polímero del mismo tipo nuevas. Más particularmente, los inventores proponen usar unas enzimas particulares que son capaces de despolimerizar uno o más polímeros de dicho producto de plástico y producir una mezcla de los monómeros que integraban el o los polímeros originales.

50 A este respecto, un objetivo de la invención es proponer un método para reciclar al menos un producto de plástico, que comprende despolimerizar al menos un polímero del producto de plástico para convertirlo en monómeros usando una enzima y recuperar los monómeros resultantes, como se expone en la reivindicación 1.

El producto de plástico comprende al menos tereftalato de polietileno (PET).

Los monómeros recuperados se reprocesan adicionalmente para sintetizar uno o más nuevos polímeros.

La enzima es una cutinasa (EC 3.1.1.74) adecuada para despolimerizar al menos el PET del producto de plástico para convertirlo en monómeros.

5 La solicitud también describe una realización en donde la enzima es una enzima intermedia que produce y/o activa al menos una molécula intermedia adecuada para despolimerizar al menos un polímero del producto de plástico para convertirlo en monómeros.

En una realización particular, el método comprende las etapas siguientes:

- 10
- a) Poner en contacto el producto de plástico con al menos un microorganismo que expresa y excreta la cutinasa;
 - b) Recuperar los monómeros de ácido tereftálico (TA) resultantes de la despolimerización del PET de dicho producto de plástico para polimerizar nuevo(s) polímero(s).

En una realización particular, el microorganismo que expresa y excreta dicha enzima es un microorganismo recombinante con un metabolismo modificado que evita el consumo de los monómeros resultantes.

15 En una realización particular adicional, el microorganismo es un microorganismo recombinante que expresa y excreta una enzima degradadora recombinante.

En otra realización particular, el método comprende las etapas siguientes:

- 20
- a) Poner en contacto el producto de plástico con al menos una cutinasa;
 - b) Recuperar los monómeros TA resultantes de la despolimerización del PET de dicho producto de plástico para polimerizar nuevo(s) polímero(s).

Según la invención, la enzima degradadora puede usarse con al menos un agente lipófilo y/o hidrófilo.

El producto de plástico puede pretratarse antes de su degradación. Más particularmente, el pretratamiento puede incluir una modificación mecánica/física del producto de plástico, como corte e impacto, trituración y molturación, fraccionamiento, etapa de enfriamiento criogénico, desecación, deshidratación, aglomeración o granulación.

25 En una realización particular, los productos de plástico pueden adicionalmente clasificarse, lavarse y/o limpiarse biológicamente antes de su degradación.

Estos y otros objetivos y realizaciones de la invención resultarán más evidentes tras la descripción detallada de la invención, que incluye realizaciones preferidas de la misma dadas en términos generales.

Breve descripción de las figuras

30 La Figura 1 muestra la producción de ácido láctico tras la hidrólisis del polímero de ácido poliláctico contenido en pelets de plástico según el procedimiento descrito. El ajuste del pH para mantenerlo alrededor de 8 permite aumentar la producción de monómero incluso tras 48 h o 72 h;

la Figura 2 muestra que un tereftalato de polietileno contenido en un producto de plástico puede hidrolizarse mediante el procedimiento de la invención y pueden recuperarse los monómeros de ácido tereftálico;

35 la Figura 3 muestra el impacto del tamaño de partícula de un producto de plástico PET sobre la eficacia del procedimiento de la invención.

Descripción detallada de la invención

40 La presente invención se refiere a un procedimiento de reciclamiento completo para reciclar un producto de plástico mediante despolimerización de al menos el PET que constituye dicho producto de plástico, en donde se genera y recupera una mezcla de monómeros repolimerizables para polimerizar polímero(s) nuevo(s).

Definiciones

La presente descripción se entenderá mejor por referencia a las definiciones siguientes.

45 Dentro del contexto de la invención, el término "*producto de plástico*" se refiere a cualquier artículo fabricado a partir de al menos un material plástico, tal como lámina, tubo, varilla, perfil, matriz, bloque macizo, fibra de plástico, etc., que contiene al menos un polímero, y posiblemente otras sustancias o aditivos, tales como plastificantes, cargas minerales u orgánicas. Preferiblemente, el producto de plástico está constituido por una mezcla de polímeros

semicristalinos y/o amorfos, o polímeros semicristalinos y aditivos. Más preferiblemente, el producto de plástico es un producto fabricado como envases, láminas agrícolas, artículos desechables o similares. Los materiales plásticos de la invención incluyen plásticos sintéticos, degradables y biodegradables. Dentro del contexto de la invención, los cauchos naturales y sintéticos no se consideran materiales plásticos, y los productos de caucho quedan excluidos del alcance de la invención.

Un “*polímero*” se refiere a un compuesto químico o una mezcla de compuestos químicos cuya estructura está constituida por múltiples unidades de repetición enlazadas mediante enlaces químicos covalentes. Dentro del contexto de la invención, el término polímero incluye polímeros naturales o sintéticos, constituidos por un único tipo de unidad de repetición (es decir, homopolímeros) o por una mezcla de diferentes unidades de repetición (es decir, copolímeros de bloques o copolímeros con estructuras distribuidas al azar).

Un “*procedimiento de reciclamiento*” en lo que respecta a un producto de plástico se refiere a un procedimiento mediante el que se degrada al menos un polímero de dicho producto de plástico para producir monómeros repolimerizables, que se recuperan con el fin de ser reutilizados.

En la presente descripción, un “*microorganismo recombinante*” se refiere a un microorganismo cuyo genoma se ha modificado mediante inserción de al menos una secuencia o unidad de ácido nucleico. Habitualmente, la secuencia o unidad de ácido nucleico insertada no está presente de forma natural en el genoma del microorganismo. Dicha secuencia o unidad de ácido nucleico se ha ensamblado y/o insertado en dicho microorganismo o un ancestro del mismo usando tecnología de ADN recombinante (también denominada clonación de genes o clonación molecular), que se refiere a técnicas para transferir ADN de un organismo a otro. La secuencia o unidad de ácido nucleico puede integrarse en el cromosoma microbiano o presentarse sobre un plásmido. Un “*microorganismo recombinante*” se refiere además a un microorganismo cuyo genoma se ha modificado mediante inactivación o delección de al menos una secuencia o unidad de ácido nucleico. El microorganismo recombinante resultante puede fabricarse mediante una serie de métodos y, una vez fabricado, puede reproducirse sin el uso de tecnología de ADN recombinante adicional. De otro modo, el microorganismo recombinante puede obtenerse de una biblioteca metagenómica.

Los términos “ácido nucleico”, “secuencia nucleica”, “polinucleótido”, “oligonucleótido” y “secuencia de nucleótidos” se usan indistintamente y se refieren a una secuencia de desoxirribonucleótidos y/o ribonucleótidos. La secuencia de nucleótidos se puede preparar primero mediante, p. ej., técnicas recombinantes, enzimáticas y/o químicas y, posteriormente, replicar en una célula huésped o un sistema *in vitro*. La secuencia de nucleótidos preferentemente comprende un marco de lectura abierta que codifica un (poli)péptido. La secuencia de nucleótidos puede contener secuencias adicionales tales como un terminador de la transcripción, un péptido señal, un intrón, etc.

Dentro del contexto de la invención, el término “*obtenida/o a partir de un microorganismo*” en lo que respecta a una enzima o un (poli)péptido indica que la enzima o el (poli)péptido se ha aislado a partir de tal microorganismo, o que la enzima o el (poli)péptido comprende toda o una parte biológicamente activa de la secuencia de aminoácidos de una enzima o un (poli)péptido aislado o caracterizado a partir de tal microorganismo.

El término “*vector*” se refiere a una molécula de ADN usada como vehículo para transferir material genético recombinante a una célula huésped. Los tipos principales de vectores son los plásmidos, bacteriófagos, virus, cósmidos y cromosomas artificiales. El propio vector generalmente es una secuencia de ADN que consiste en una inserción (una secuencia de ácido nucleico heteróloga, transgén) y una secuencia más grande que funciona como “esqueleto” del vector. Habitualmente, el fin de un vector que transfiere información genética al huésped es aislar, multiplicar o expresar la inserción en la célula diana. Los vectores denominados vectores de expresión (construcciones de expresión) están específicamente adaptados para la expresión de las secuencias heterólogas en la célula diana y, generalmente, tienen una secuencia de promotor que estimula la expresión de las secuencias heterólogas que codifican un polipéptido. Generalmente, los elementos reguladores que están presentes en un vector de expresión incluyen un promotor transcripcional, un sitio de unión del ribosoma, un terminador y, opcionalmente, presentan un operador. Preferiblemente, un vector de expresión también contiene un origen de replicación para la replicación autónoma en una célula huésped, un marcador seleccionable, un número limitado de sitios para enzimas de restricción útiles y potencial para un número de copias alto. Ejemplos de vectores de expresión son los vectores de clonación, los vectores de clonación modificados, los plásmidos diseñados específicamente y los virus. Los vectores de expresión que proporcionan niveles adecuados de expresión de polipéptidos en diferentes huéspedes son bien conocidos en la técnica. Los vectores de expresión bacterianos bien conocidos en la técnica incluyen el pET11a (Novagen), lambda gt11 (Invitrogen).

Los vectores de expresión pueden introducirse en células huésped usando técnicas normalizadas. Los ejemplos de tales técnicas incluyen la transformación, transfección, lipotransfección, fusión de protoplastos y electroporación. Los ejemplos de técnicas para introducir ácido nucleico en una célula y expresar el ácido nucleico para producir proteína se proporcionan en documentos de consulta tales como Ausubel, Current Protocols in molecular biology, John Wiley, 1987-1998, y Sambrook, *et al.*, en Molecular cloning, A laboratory Manual 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

Productos de plástico

La presente invención propone degradar los productos de plástico que comprenden tereftalato de polietileno (PET) amorfo y/o semicristalino hasta el nivel de monómero, de forma que dichos monómeros puedan reutilizarse para repolimerizar polímeros y fabricar además productos de plástico nuevos.

5 El método de la invención puede usarse para reciclar productos de plástico fabricados con varios materiales plásticos diferentes. Por ejemplo, el producto de plástico puede comprender capas sucesivas de materiales plásticos diferentes.

10 El procedimiento de reciclamiento de la invención puede usarse para degradar todas las clases de productos de plástico que comprenden tereftalato de polietileno (PET) amorfo y/o semicristalino, sin necesidad de clasificación y/o limpieza preliminares del plástico. Más particularmente, el procedimiento de la invención puede aplicarse directamente a productos de plástico que proceden de la recogida de desechos de plástico. Por ejemplo, el procedimiento de la invención puede aplicarse sobre una mezcla de desechos de plástico domésticos, que incluyen botellas de plástico, bolsas de plástico, envases de plástico, desechos textiles, etc.

15 Los productos de plástico objetivo del procedimiento de la invención pueden comprender diferentes clases de materiales plásticos, que incluyen materiales plásticos sintéticos, derivados de petroquímicas o materiales plásticos de base biológica (es decir, compuestos en su totalidad o en una parte significativa por productos biológicos).

Los productos de plástico objetivo pueden contener uno o varios polímeros, y aditivos. Un producto de plástico puede estar formado por varias clases de polímeros dispuestas en diferentes capas o fundidas todas juntas. Asimismo, el producto de plástico puede estar constituido por polímeros semicristalinos o una mezcla de polímeros semicristalinos y amorfos, así como aditivos.

20 Los productos de plástico contienen PET y, opcionalmente, otros poliésteres y/o poliamidas. Los poliésteres preferidos son tereftalato de politrimetileno (PTT), tereftalato de polibutileno (PBT), tereftalato de polietileno isosorbida (PEIT), ácido poliláctico (PLA), poli(ácido L-láctico) (PLLA), poli(ácido D-láctico) (PDLA), poli(ácido D,L-láctico) (PDLLA), PLA estereocomplejo (scPLA), polihidroxiálcanoato (PHA), poli(3-hidroxiбутирато) (P(3HB)/PHB), poli(3-hidroxi valerato) (P(3HV)/PHV), poli(3-hidroxi hexanoato) (P(3HHx)), poli(3-hidroxi octanoato) (P(3HO)), poli(3-hidroxi decanoato) (P(3HD)), poli(3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi valerato) (P(3HB-co-3HV)/PHBV), poli(3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi hexanoato) (P(3HB-co-3HHx)/(PHBHHx)), poli(3-hidroxi butirato-co-5-hidroxi valerato) (PHB5HV), poli(3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi propionato) (PHB3HP), polihidroxi butirato-co-hidroxi octanoato (PHBO), polihidroxi butirato-co-hidroxi octadecanoato (PHBOd), poli(3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi valerato-co-4-hidroxi butirato) (P(3HB-co-3HV-co-4HB)), succinato de polibutileno (PBS), succinato-adipato de polibutileno (PBSA), adipato tereftalato de polibutileno (PBAT), furanoato de polietileno (PEF), policaprolactona (PCL), poli(adipato de etileno) (PEA) y mezclas/combinaciones de estos materiales, y las poliamidas preferidas son poliamida-6 o poli(ϵ -caprolactama) o policaproamida (PA6), poliamida-6,6 o poli(hexametileno adipamida) (PA6,6), poli(11-aminoundecanoamida) (PA11), polidodecanolactama (PA12), poli(tetrametileno adipamida) (PA4,6), poli(pentametileno sebacamida) (PA5,10), poli(hexametileno azelaamida) (PA6,9), poli(hexametileno sebacamida) (PA6,10), poli(hexametileno dodecanoamida) (PA6,12), poli(m-xilileno adipamida) (PAMXD6), copolímero de polihexametileno adipamida/polihexametileno tereftalamida (PA66/6T), copolímero de polihexametileno adipamida/polihexametileno isoftalamida (PA66/6I) y mezclas/combinaciones de estos materiales.

En otra realización, el producto de plástico está constituido por tereftalato de polietileno, más particularmente semicristalinos.

40 Degradación del plástico

Un objeto de la presente invención es proporcionar enzimas degradadoras adecuadas para hidrolizar los enlaces químicos entre los monómeros de tereftalato de polietileno (PET) amorfo y/o semicristalino de un producto de plástico.

Según la invención, tal enzima degradadora es una cutinasa.

45 Por ejemplo, puede usarse una cutinasa (como la de *Thermobifida fusca* o *Thermobifida alba* o *Fusarium solani pisi*) para despolimerizar un producto de plástico que contiene PET.

El producto de plástico que se va a reciclar se pone en contacto con la enzima degradadora, que puede ser natural o sintética.

50 Por ejemplo, la enzima degradadora se puede producir mediante técnicas recombinantes, o se puede aislar o purificar a partir de fuentes naturales, cuando está presente de forma natural, o se puede producir artificialmente. La enzima puede estar en forma soluble, o en fase sólida. En concreto, puede estar unida a membranas celulares o vesículas lipídicas, o a soportes sintéticos tales como vidrio, plástico, polímeros, filtro, membranas, p. ej., en forma de lechos, columnas, placas y similares.

55 Las enzimas están preferiblemente en forma aislada o purificada. Preferentemente, las enzimas de la invención se expresan, derivan, se secretan, se aíslan o se purifican a partir de un microorganismo. Las enzimas pueden

purificarse mediante técnicas conocidas *per se* en la técnica y almacenarse con técnicas convencionales. Las enzimas se pueden modificar adicionalmente para mejorar, p. ej., su estabilidad o actividad.

5 En otra realización, el producto de plástico que se va a reciclar se pone en contacto con un microorganismo que sintetiza y excreta la enzima degradadora. En el contexto de la invención, la enzima se puede excretar en el medio de cultivo o hacia la membrana celular del microorganismo, en donde dicha enzima se puede anclar.

Dicho microorganismo puede sintetizar la enzima degradadora naturalmente, o puede ser un microorganismo recombinante, en donde se ha insertado una secuencia de nucleótidos recombinante que codifica la enzima degradadora usando, por ejemplo, un vector.

10 Por ejemplo, se inserta una molécula de nucleótido, que codifica la enzima degradadora de interés, en un vector, p. ej., un plásmido, virus recombinante, fago, episoma, cromosoma artificial y similares. Ventajosamente, la molécula de nucleótido está bajo el control de un promotor específico. El vector se transfecta a continuación a microorganismos huésped para formar microorganismos recombinantes. Los huéspedes se cultivan adicionalmente en condiciones de cultivo adecuadas para los huéspedes para, de ese modo, obtener células recombinantes que contienen la enzima de la presente invención. Las condiciones de cultivo adecuadas para el huésped son bien conocidas por los expertos en la técnica.

15 La molécula de nucleótido de la invención puede estar en forma aislada o purificada, y se puede fabricar, aislar y/o manipular mediante técnicas conocidas *per se* en la técnica, p. ej., clonación y expresión de bibliotecas de ADNc, amplificación, síntesis enzimática o tecnología recombinante. La molécula de nucleótido también se puede sintetizar *in vitro* mediante técnicas de síntesis química bien conocidas. Las moléculas de nucleótido de esta invención pueden comprender secuencias de nucleótidos adicionales, tales como regiones reguladoras, es decir, promotores, mejoradores de cadena, silenciadores, terminadores y similares, que pueden usarse para inducir o regular la expresión de la enzima en una célula o un sistema huésped seleccionado.

20 Los microorganismos recombinantes pueden usarse directamente. De otro modo, o además, las enzimas recombinantes pueden purificarse a partir del medio de cultivo. Puede usarse cualquier medio de separación/purificación utilizado habitualmente, tal como precipitación por adición de sal, filtración por gel, cromatografía hidrofóbica o cromatografía de intercambio iónico, para este fin.

25 En realizaciones particulares, pueden usarse microorganismos que se sabe que sintetizan y excretan enzimas degradadoras. Por ejemplo, pueden usarse *Aspergillus oryzae*, *Humicola insolens*, *Penicillium citrinum*, *Fusarium solani* y *Thermobifida cellulolytica*, que sintetizan y excretan una cutinasa para degradar un producto de plástico que contiene PET. Del mismo modo, la *Candida antarctica*, el *Thermomyces lanuginosus*, la *Burkholderia sp.* y el *Triticum aestivum* sintetizan una lipasa que despolimeriza el PET.

30 Pueden usarse varios microorganismos y/o enzimas purificadas y/o enzimas sintéticas de forma conjunta o secuencialmente para despolimerizar diferentes clases de polímeros contenidos en un mismo producto de plástico o en productos de plástico diferentes.

35 Ventajosamente, el microorganismo de la invención presenta un metabolismo modificado con el fin de evitar el consumo de los monómeros obtenidos a partir del polímero degradado. Por ejemplo, el microorganismo es un microorganismo recombinante, en donde se han eliminado o suprimido las enzimas que degradan dichos monómeros. De otro modo, el procedimiento de la invención puede realizarse en un medio de cultivo que contenga al menos una fuente de carbono utilizable por el microorganismo, de forma que dicho microorganismo consuma preferentemente esta fuente de carbono en lugar de los monómeros.

40 Ventajosamente, el producto de plástico se pone en contacto con un medio de cultivo que contiene los microorganismos, glucosa o similares como fuente de carbono, así como una fuente de nitrógeno orgánico asimilable por los microorganismos, que incluye una fuente de nitrógeno orgánica (p. ej., peptona, extracto de carne, extracto de levadura, licor de maíz fermentado) o una fuente de nitrógeno inorgánico (p. ej., sulfato de amonio, cloruro de amonio). Si es necesario, el medio de cultivo puede contener además sales inorgánicas (p. ej., ion sodio, ion potasio, ion calcio, ion magnesio, ion sulfato, ion cloro, ion fosfato). Asimismo, el medio también puede estar suplementado con componentes en trazas tales como vitaminas, oligoelementos y aminoácidos.

Parámetros del procedimiento de reciclamiento

45 Según la invención, un producto de plástico que comprende tereftalato de polietileno (PET) amorfo y/o semicristalino puede reciclarse poniendo en contacto dicho producto de plástico con una cutinasa que se dirige al menos al PET de dichos productos de plástico y/o con un microorganismo que sintetiza y excreta tal cutinasa.

El procedimiento de la invención es especialmente útil para degradar un PET semicristalino contenido en un producto de plástico que contiene dicho PET semicristalino y, en última instancia, uno o varios otros polímeros semicristalinos y/o amorfos y/o aditivos.

55 En una realización particular, el producto de plástico puede tratarse preliminarmente para cambiar físicamente su

estructura con el fin de aumentar la superficie de contacto entre los polímeros y las enzimas. Por ejemplo, el producto de plástico se puede transformar en una emulsión o un polvo, que se añade a un medio líquido que contiene los microorganismos y/o las enzimas. De otro modo, el producto de plástico se puede moltrar mecánicamente, granular, peletizar, etc., para reducir la forma y el tamaño del material antes de añadirlo a un medio líquido que contiene los microorganismos y/o las enzimas.

El tiempo necesario para la degradación de un producto de plástico puede variar en función del propio producto de plástico (es decir, la naturaleza y el origen del producto de plástico, su composición, forma, etc.), el tipo y la cantidad de microorganismos/enzimas usados, así como de diversos parámetros del procedimiento (es decir, temperatura, pH, agentes adicionales, etc.). Un experto en la técnica puede adaptar fácilmente los parámetros del procedimiento a los productos de plástico y/o las enzimas degradadoras.

Ventajosamente, el procedimiento se implementa a una temperatura comprendida entre 20 °C y 80 °C, más preferiblemente entre 25 °C y 60 °C. Preferiblemente, la temperatura se mantiene entre 25 °C y 50 °C al menos durante la etapa de despolimerización. En términos más generales, la temperatura se mantiene por debajo de una temperatura de inactivación, que corresponde a la temperatura a la que la enzima se inactiva y/o el microorganismo ya no sintetiza la enzima degradadora. Sorprendentemente, los inventores descubrieron que el procedimiento de la invención puede implementarse a una temperatura inferior a la T_g del polímero objetivo. Según la invención, la cantidad de enzima añadida para la etapa de despolimerización puede ser de al menos el 0,005 % en peso de los productos de plástico, preferiblemente al menos del 0,1 % y más preferiblemente al menos del 1 %. Y la cantidad añadida es ventajosamente como máximo del 15 % en peso de los productos de plástico y más preferiblemente como máximo del 5 %. Ventajosamente, la cantidad de enzima degradadora está en un intervalo del 0,005 % al 15 % en peso de producto de plástico, preferiblemente en un intervalo del 0,1 % al 10 % y más preferiblemente en un intervalo del 1 % al 5 %.

El pH del medio está en el intervalo de 4 a 10. Ventajosamente, el pH se ajusta según la pareja polímero/enzima objetivo para mejorar la eficacia del procedimiento. Más particularmente, el pH se ajusta para que se mantenga al pH óptimo de la cutinasa. De hecho, la despolimerización de poliésteres produce monómeros ácidos que inducen una reducción del pH. Se puede usar una adición de un álcali diluido para compensar esta acidificación y mantener el pH en el óptimo.

En una realización particular, se añade al menos un agente lipófilo y/o agente hidrófilo al medio para mejorar la etapa de despolimerización. Se puede añadir un inductor tal como gelatina al medio para mejorar la producción de enzima. Se puede añadir un tensioactivo tal como Tween al medio para modificar la energía en la interfase entre el polímero y la enzima o el microorganismo y mejorar la eficacia de degradación. Se podría usar una sustancia orgánica para expandir el polímero y aumentar su accesibilidad al microorganismo o la enzima.

Ventajosamente, el procedimiento de la invención se realiza sin acelerante de la degradación. En una realización particular, el procedimiento de la invención se realiza en un líquido de degradación que contiene solo la enzima degradadora y agua. En una realización particular, el procedimiento de la invención se realiza sin disolvente orgánico.

El tiempo de reacción para la despolimerización de al menos un PET del producto de plástico está comprendido ventajosamente entre 5 y 72 horas. Tal tiempo de reacción puede permitir que la despolimerización avance lo suficiente y no resultará económicamente perjudicial.

Tratamiento y reutilización de los monómeros recuperados

Al final de la etapa de despolimerización, se recupera una mezcla de los monómeros resultantes de la despolimerización del PET, de forma secuencial o continua. Se puede recuperar un único monómero o varios monómeros diferentes, en función de los polímeros despolimerizados y/o de los productos de plástico reciclados.

Los monómeros se pueden purificar adicionalmente, usando cualquier método de purificación adecuado, y acondicionar en una forma repolimerizable. Los ejemplos de métodos de purificación incluyen el procedimiento de destilación, separación mediante solución acuosa, condensación selectiva de vapor, filtración y concentración del medio tras el bioprocesamiento, separación, destilación evaporación al vacío, extracción, electrodiálisis, adsorción, intercambio iónico, precipitación, cristalización, concentración, deshidratación y precipitación por adición de ácido, nanofiltración, tratamiento con catalizador ácido, destilación en modo semicontinuo o destilación en modo continuo, extracción en disolvente, concentración evaporativa, cristalización evaporativa, extracción líquido/líquido, hidrogenación, procedimiento de destilación azeotrópica, adsorción, cromatografía en columna, destilación al vacío sencilla y microfiltración, combinadas o no.

Los monómeros repolimerizables se reutilizan a continuación para sintetizar polímeros. Ventajosamente, se repolimerizan polímeros de la misma naturaleza. Sin embargo, es posible mezclar los monómeros recuperados con otros monómeros y/o oligómeros con el fin de sintetizar copolímeros nuevos.

En una realización particular, la repolimerización se lleva a cabo usando una hidrolasa en condiciones apropiadas para permitir la reacción de polimerización. Se pueden añadir iniciadores a la solución de monómero para favorecer

plásmidos y fragmentos de ADN se purificaron mediante equipos de reactivos para purificación de ADN de Qiagen (Qiagen, Alemania). Los productos de la RCP amplificados purificados así obtenidos se digirieron con las endonucleasas de restricción NdeI y HindIII (New England Biolabs, EE. UU.), se desfosforilaron con fosfatasa alcalina (Roche, Alemania) y se ligaron al pET26b(p) con ADN-ligasa T4 (Fermentas, Alemania) y transformaron en *E. coli* BL21-Gold(DE3) según las instrucciones del fabricante.

La secuencia del gen se determinó mediante secuenciación de ADN usando los cebadores 5'-GAGCGGATAACAATTCCCCTCTAGAA-3' ((SEQ ID 3) y 5'-CAGCTTCCTTTTCGGGCTTTGT-3' (SEQ ID 4). El ADN se secuenció como servicio personalizado (Agowa, Alemania). El análisis y la manipulación de secuencias de ADN se realizó con Vector NTi Suite 10 (Invitrogen, EE. UU.). Las secuencias de proteínas se alinearon usando el programa Clustal W (nodo servidor suizo de la EMBnet). La secuencia de nucleótidos del gen aislado se ha depositado en la base de datos GenBank con el número de acceso HQ147786 (Thc_cut2).

Se usaron células de *E. coli* BL21-Gold (DE3) recién transformadas para inocular 20 mL de medio LB suplementado con 40 µg/mL de kanamicina y se cultivaron durante la noche a 37 °C y 160 rpm. El cultivo realizado durante la noche se usó para inocular 200 mL de medio LB con 40 µg/mL de kanamicina a OD600 = 0,1 y se incubaron hasta que se alcanzó una OD600 = 0,6-0,8. Después, se enfrió el cultivo a 20 °C y se indujo con IPTG a una concentración final de 0,05 mM. La inducción se llevó a cabo durante 20 h a 20 °C y 160 rpm. Las células se cosecharon mediante centrifugación (20 min, 4 °C, 3200 g).

Se resuspendió el sedimento de células de 200 mL de cultivo celular en 30 mL de tampón de unión (NaH₂PO₄*2H₂O 20 mM, NaCl 500 mM, imidazol 10 mM, pH 7,4). Las células resuspendidas se sometieron a ultrasonidos con tres pulsos de 30 s bajo enfriamiento con hielo (Vibra Cell, Sonics Materials, Meryin/Satigny, Suiza). Los lisados se centrifugaron (30 min, 4 °C, 4000 g) y filtraron a través de una membrana de 0,2 µm. El lisado celular se purificó usando un sistema de purificación Akta con columnas HisTrap FF (tampón de elución NaH₂PO₄*2H₂O 20 mM, NaCl 500 mM, imidazol 500 mM, pH 7,4). Para la caracterización de cutinasa se intercambió el tampón de elución de cola de polihistidina por Tris HCl 100 mM pH 7,0 mediante el uso de columnas de desalación PD-10 (GE Healthcare).

Las concentraciones de proteína se determinaron mediante el equipo de reactivos para ensayo de proteínas de Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories GmbH) y albúmina sérica bovina como proteína patrón. Se realizó SDS-PAGE según Laemmli (Laemmli, U.K. Nature 1970, 227 (5259), 680-685) y se tiñeron las proteínas con Coomassie Brilliant Blue R-250.

Todos los productos químicos fueron de grado analítico y procedentes de Sigma (Alemania).

Reacción de hidrólisis

La hidrólisis de los productos de plástico se realizó como se indica a continuación. En cada muestra, se incubaron 10 mg de producto de plástico con cutinasa 5 µM en 1 mL de tampón K₂HPO₄/KH₂PO₄ 100 mM, pH 7,0 durante de 6 h a 72 h a 50 °C con agitación a 300 rpm en un Thermomixer Comfort (Eppendorf). Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado.

Los controles se realizaron usando i) producto de plástico en tampón sin enzima; ii) enzima en tampón sin producto de plástico.

Ensayo de ácido tereftálico (TA)

Tras el tratamiento enzimático, se precipitaron las proteínas usando metanol absoluto (Merck) en hielo 1:1 (v/v). Las muestras se centrifugaron (Hettich MIKRO 200 R, Tuttlingen, Alemania) a 16 000 g a 0 °C durante 15 min. El sobrenadante se llevó a un vial de HPLC y se acidificó añadiendo 3,5 µL de HCl 6 N. La HPLC usada fue una DIONEX P-580 PUMP (Dionex Cooperation, Sunnyvale, EE. UU.), con un inyector de muestras automatizado ASI-100 y un detector de haz de fotodiodos PDA-100. Para el análisis del TA, se usó una columna de fase reversa RP-C18 (Discovery HS-C18, 5 µm, 150 x 4,6 mm con precolumna, Supelco, Bellefonte, EE. UU.). El análisis se llevó a cabo con un 60 % de agua, 10 % de H₂SO₄ 0,01 N y 30 % de metanol como eluyente, gradual (15 min) al 50 % de metanol y 10 % de ácido, gradual (a 20 min) 90 % de metanol y ácido, permaneciendo 2 min y, a continuación, gradual a la posición de partida, 5 min posciclo. El caudal se ajustó a 1 mL/min y la columna se mantuvo a una temperatura de 25 °C. El volumen de inyección fue de 10 µL. La detección del TA se realizó con un detector de haz de fotodiodos a una longitud de onda de 241 nm. La cuantificación fue posible usando patrones de ácido tereftálico (código Merck: 800762) diluidos en tampón:MetOH 1:1 con diferentes concentraciones (1, 5, 10, 50, 100, 250 µM) preparados de la misma forma que las muestras.

Resultados

Los presentes experimentos demostraron que los productos de plástico formulados con PET y aditivos pueden reciclarse usando el procedimiento de la invención. Asimismo, con el fin de mejorar la recuperación de monómero, ventajosamente, se puede realizar un pretratamiento mecánico del producto de plástico que aumenta la superficie de contacto entre producto de plástico y enzima.

ES 2 707 304 T3

Más particularmente, la lámina de PET se hidrolizó mediante cutinasa durante 72 h para obtener TA. Cuanto más largo era el tiempo de reacción, más TA se producía (figura 2).

Se hidrolizó el PTT mediante cutinasa: se obtuvo TA $4,087 \pm 0,122 \mu\text{M}$ en 24 h.

5 Se hidrolizó la botella de PET en forma de polvo con tamaño de partícula de 1 mm mediante cutinasa: se obtuvo TA $7,301 \pm 0,162 \mu\text{M}$ en 24 h. Por consiguiente, el procedimiento de la invención también puede aplicarse a plástico de PET formulado con aditivos, como los encontrados en los desechos de plástico.

10 Se hidrolizaron diferentes tamaños de partícula de polvo de botella de PET mediante cutinasa para obtener TA en 24 h. La reducción del tamaño de partícula mediante molturación mecánica mejoró la eficacia de la enzima para producir más TA: TA $15,296 \pm 1,012 \mu\text{M}$ con tamaño de partícula de $250 \mu\text{m}$ en lugar de TA $7,301 \pm 0,162 \mu\text{M}$ con tamaño de partícula de 1 mm (figura 3).

Lista de secuencias

- <110> CARBIOS
- <120> Método para reciclar productos de plástico
- <130> B1504PC
- 5 <160> 10
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 31
- <212> ADN
- 10 <213> secuencia artificial
- <220>
- <223> cebador
- <400> 1
- ccccgctca tatggccaac ccctacgagc g 31
- 15 <210> 2
- <211> 59
- <212> ADN
- <213> secuencia artificial
- <220>
- 20 <223> cebador
- <400> 2
- gtgttctaag cttcagtggt ggtggtggtg gtgctcgagt gccaggcact gagagtagt 59
- <210> 3
- <211> 26
- <212> ADN
- 25 <213> secuencia artificial
- <220>
- <223> cebador
- <400> 3
- 30 gagcggataa caattcccct ctagaa 26
- <210> 4
- <211> 21
- <212> ADN
- <213> secuencia artificial
- 35 <220>
- <223> cebador
- <400> 4
- cagcttcctt tcgggcttg t 21
- <210> 5
- <211> 717
- <212> ADN
- 40 <213> Amycolatopsis sp. K104-1

ES 2 707 304 T3

<400> 5
 gtgaaattcg gcaagttcgt cctgctggcc gcgagcaccg cactggccgt cgtcggcctc 60
 ggcggtccgg cggccgccga cagcaccocg caggcccagc cgtcgatcat cgggtggcagc 120
 aacgccacca gtggcccctg ggcggcccgg ctgttcgtca acggccggca gaactgcacc 180
 gcgacgatca tcgccccga gtacatcctc accgccaagc actgctcag cagctccggc 240
 acctacacgt tccgcatcgg cagcctggac cagacgagcg gcggcacgat ggccaccggc 300
 tccacgatca cgcgctaccc gggctccgcc gacctggcga tcgtccggct caccacctcg 360
 gtgaacgccca cctactcgcc actcggcagc gtcggtgacg tttcggtcgg ccagaacgtc 420
 tcggtctacg gctggggcgc gaccagccag tgcggtccg agatcaactg ccagtgcggg 480
 tacctgaagg tcgcgacggt gcgggtgaac tcgatcagct gcagcgacta caccggcggc 540
 gtcgccgtgt gcgcgaaccg cgtcaacggc atcaccgccg gcggcgactc cggcggcccg 600
 atgttcgctt ccggccgccga ggtcggcgtc gcgtcgacca gcgaccgggt gaacaacaag 660
 gcgtacacca acatcacgcg ttatcgcagc tggatttcgc aggtggcggg cgtctga 717

<210> 6
 <211> 1191
 <212> ADN
 <213> E. Coli

5

<400> 6
 atgattattt ccgcagccag cgattatcgc gccgcagcgc aacgcattct gccgccgttc 60
 ctgttccact atatggatgg tggatcatat tctgaataca cgctgcgccg caacgtggaa 120
 gatttgtcag aagtggcgct gcgccagcgt attctgaaaa acatgtccga ctttaagcctg 180
 gaaacgacgc tgtttaatga gaaattgtcg atgccgggtg cactggctcc ggtgggtttg 240
 tgtggcatgt atgcgcgtcg tggcgaagtt caggcagcca aagggcgga cgcgcatggt 300
 attccgttta ctctctcgac ggtttccgtt tgcccgattg aagaagtgc gccagccatc 360
 aagcgcctaa tgtggttcca gctttatgta ctgcgcgatc gcggctttat gcgtaacgcg 420
 ctggagcgag caaaagcagc gggttgttcg acgctggttt tcaccgtgga tatgccgaca 480
 ccgggcgcac gctaccgtga tgcgcattca ggtatgagcg gcccgaacgc ggcaatgcgc 540
 cgctacttgc aagcgggtgac acatccgcaa tgggcgtggg atgtgggcct gaacggtcgt 600
 ccacatgatt taggtaatat ctacgcttat ctcgcaaac cgaccggact ggaagattac 660
 atcgctggc tggggaataa cttcgatccg tccatctcat ggaaagacct tgaatggatc 720
 cgcgatttct gggatggccc gatggtgatc aaagggatcc tcgatccgga agatgcgcgc 780
 gatgcagtac gttttggtgc tgatggaatt gtggtttcta accacgggtg ccgccagctg 840
 gacggtgtac tctcttccgc ccgtgcactg cctgctattg cagatgcggt gaaaggtgat 900
 atagccattc tggcggatag cggaaatcgt aacgggcttg atgtcgtgcg tatgattgcg 960
 ctcggtgccg acaccgtact gctgggtcgt gctttcttgt atgcgctggc aacagcgggc 1020
 caggcgggtg tagctaacct gctaaatctg atcgaaaaag agatgaaagt ggcgatgacg 1080
 ctgactggcg cgaaatcgat cagcgaatc acgcaagatt cgctgggtgca ggggctgggt 1140
 aaagagttgc ctgcggcact ggctcccatg gcgaaagga atgcggcata g 1191

10

ES 2 707 304 T3

<210> 7
<211> 40
<212> ADN
<213> secuencia artificial

5 <220>
<223> cebador

<400> 7
atgattatt ccgcagccag catatgaata tctccttag 40

10 <210> 8
<211> 40
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador

15 <400> 8
gcttccctt acgccgtatc tgtaggctgg agctgcttcg 40

<210> 9
<211> 20
<212> ADN
20 <213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 9
cattcgaggg agaaaaacgc 20

25 <210> 10
<211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
30 <223> cebador

<400> 10
agcaaacgcg ggggagtggg 20

35

REIVINDICACIONES

1. Un método para reciclar al menos un producto de plástico que comprende tereftalato de polietileno (PET) amorfo y/o semicristalino, comprendiendo el método
- 5 - una etapa de despolimerización, realizada a una temperatura entre 20 °C y 80 °C, en donde dicho al menos un producto de plástico se pone en contacto con una cutinasa adecuada para despolimerizar el PET hasta sus monómeros;
- una etapa de recuperar los monómeros de ácido tereftálico (TA) resultantes, y
- 10 - una etapa de reprocesar dichos monómeros de TA recuperados para polimerizar nuevo(s) polímero(s), en donde la etapa de despolimerización se lleva a cabo en un medio líquido cuyo pH se ajusta para que se mantenga al pH óptimo de la cutinasa, entre pH 4 y 10, durante toda la etapa de despolimerización.
2. El método de la reivindicación 1, en donde la etapa de despolimerización comprende poner en contacto el producto de plástico con al menos un microorganismo que expresa y excreta dicha cutinasa, en donde el microorganismo es preferiblemente un microorganismo recombinante que expresa y excreta una enzima recombinante y/o un microorganismo recombinante con un metabolismo modificado que evita el consumo de los monómeros resultantes.
- 15
3. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el producto de plástico se pretrata antes de la etapa de despolimerización, incluyendo preferiblemente el pretratamiento la modificación mecánica/física del producto de plástico para aumentar la superficie de contacto entre los polímeros y la enzima.
4. El método de la reivindicación 3, en donde el pretratamiento comprende la molturación del producto de plástico.
- 20
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde se usa al menos un agente lipófilo y/o hidrófilo junto con dicha cutinasa.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende además una etapa de purificar los monómeros antes de la etapa de reprocesar.
- 25
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde se reciclan al menos dos productos de plástico, simultánea o secuencialmente.

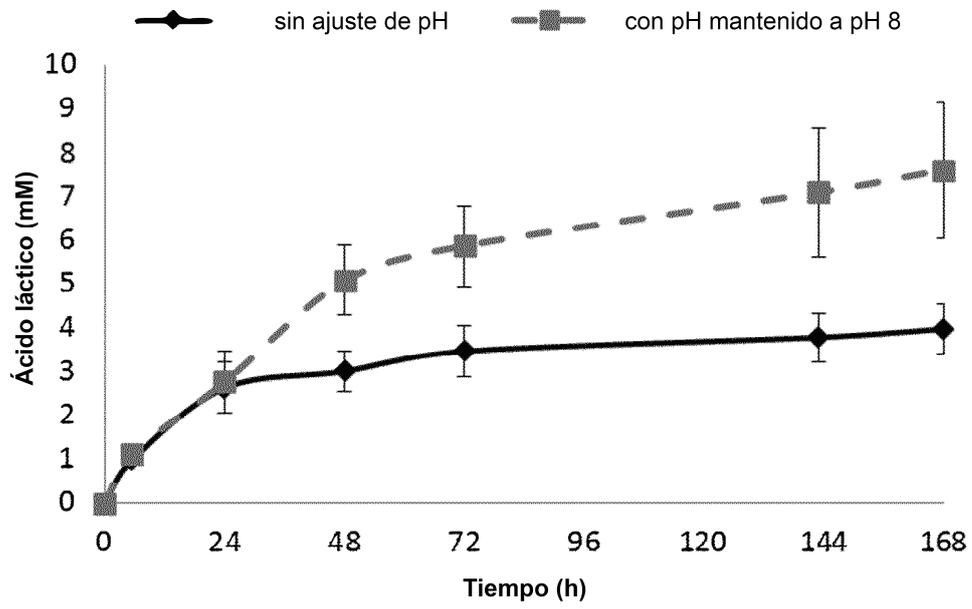


FIGURA 1

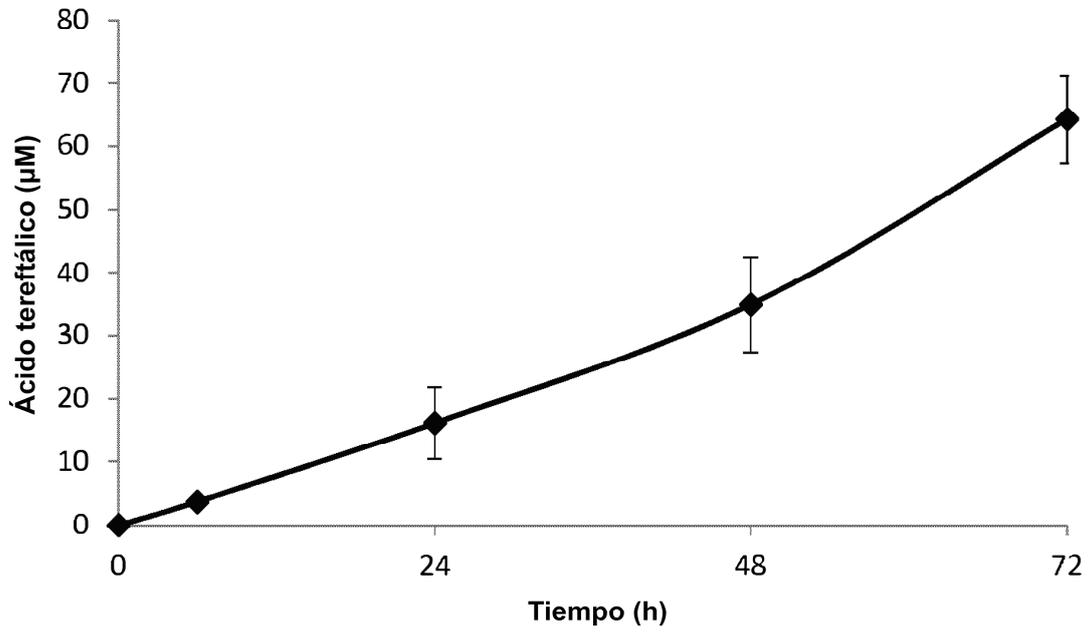


FIGURA 2

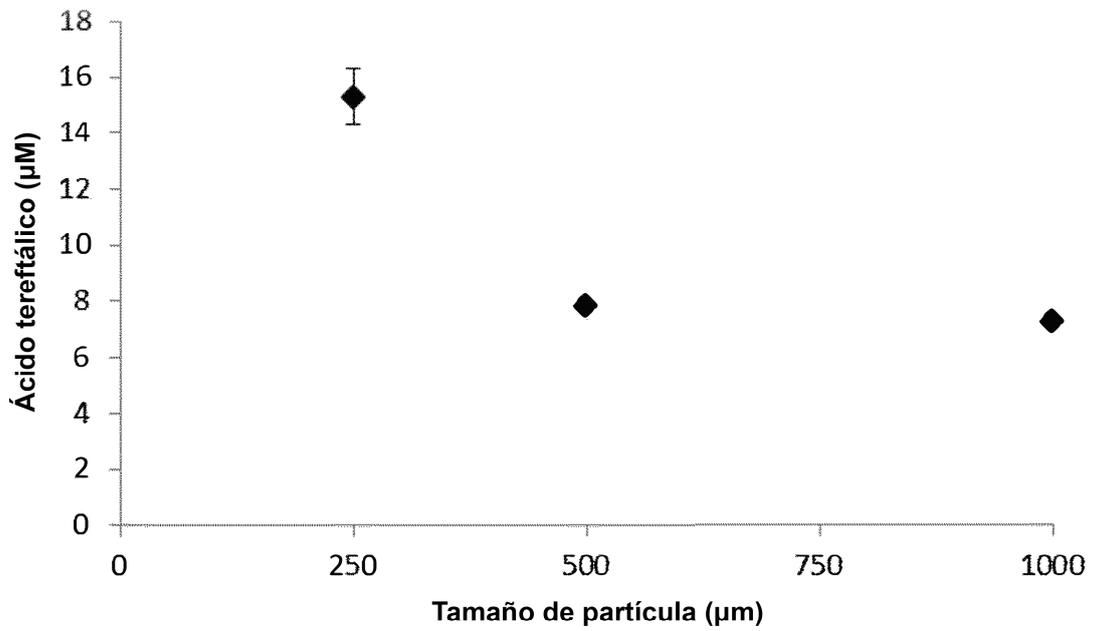


FIGURA 3