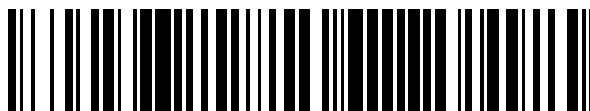


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 714 597**

51 Int. Cl.:

C08G 63/06 (2006.01)
C07C 51/363 (2006.01)
C07C 51/367 (2006.01)
C08G 63/78 (2006.01)
C12P 7/52 (2006.01)
C12P 7/54 (2006.01)
C12P 7/64 (2006.01)
C12P 7/40 (2006.01)
C12P 7/42 (2006.01)
C12P 7/62 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.02.2016 PCT/FR2016/050363**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **01.09.2016 WO16135396**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.02.2016 E 16712944 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.12.2018 EP 3262095**

54 Título: **Procedimiento para producir polihidroxialcanoatos a partir de precursores obtenidos por fermentación anaerobia a partir de biomasa fermentable**

30 Prioridad:

27.02.2015 FR 1551672

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.05.2019

73 Titular/es:

**AFYREN (100.0%)
Biopôle Clermont Limagne
63360 Saint Beuzire, FR**

72 Inventor/es:

**NOUILLE, RÉGIS;
PESSIOT, JÉRÉMY y
THIEULIN, MARIE**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 714 597 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para producir polihidroxialcanoatos a partir de precursores obtenidos por fermentación anaerobia a partir de biomasa fermentable

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para producir polihidroxialcanoatos a partir de precursores obtenidos por fermentación anaerobia a partir de biomasa fermentable.

A continuación, para facilitar la lectura, los polihidroxialcanoatos se designarán por su acrónimo: PHA. Esta familia comprende varias moléculas, en función del número de carbonos.

10 Los PHA son poliésteres termoplásticos que pueden ser producidos por fermentación microbiana a partir de azúcares de origen vegetal, en particular de almidón de maíz o de residuos vegetales. Los microorganismos producen PHA cuando se encuentran en condiciones de carencia de ciertos metabolitos asociados a una oferta excedentaria de carbono. En otras palabras, los microorganismos acumulan entonces el carbono, proveniente de los azúcares, en forma de gránulos de PHA. Los PHA se utilizan, por ejemplo, como material constitutivo de envases o en el campo médico como material de sutura. Sustituyen a los polímeros derivados del petróleo.

15 Se conocen procedimientos de fermentación que utilizan cepas puras seleccionadas de microorganismos, así como un sustrato específico para producir PHA. Dicha solución es difícilmente utilizable a escala industrial con un coste de producción aceptable.

20 Se conoce igualmente por el documento EP-A-2 749 650 un procedimiento adecuado para uso industrial. El sustrato utilizado es obtenido de efluentes y enriquecido con ácidos grasos volátiles (AGV), conocidos por ser precursores de los PHA. Utilizando un consorcio bacteriano y alternando fases de crecimiento de la biomasa y fases de carencia, de manera controlada, se estimulan el crecimiento bacteriano y la producción de PHA. Sin embargo, dicho procedimiento implica un control preciso de las condiciones de fermentación y un tratamiento adecuado para extraer los PHA producidos, lo que implica una instalación relativamente pesada. Además, dicha extracción no se puede realizar de forma continua y no permite una producción de cualquier tipo de PHA. Otro inconveniente de este procedimiento es su especificidad: no puede producir más que PHA microbianos, es decir, producidos por microorganismos. El documento WO 03/062439 describe un procedimiento destinado a convertir residuos orgánicos en materiales termoplásticos biodegradables que contienen polihidroxialcanoatos (PHA). Este procedimiento consiste en tratar los residuos orgánicos por medio de una población microbiana acidógena con el fin de formar ácidos orgánicos volátiles y polimerizar estos ácidos orgánicos por medio de especies microbianas que producen PHA con el fin de formar PHA.

30 La invención pretende más particularmente remediar estos inconvenientes proponiendo un procedimiento de producción de PHA que permite producir diversos tipos de PHA, fácilmente y sin las limitaciones asociadas con los modos de producción conocidos en el estado de la técnica.

35 Para este fin, la invención tiene por objeto un procedimiento para producir polihidroxialcanoatos o PHA a partir de moléculas de ácidos grasos volátiles (AGV), denominados precursores, producidos por fermentación anaerobia a partir de biomasa fermentable, caracterizado por que comprende al menos las siguientes etapas:

- a) extraer las moléculas de ácidos grasos volátiles (AGV), sin interrupción de la fermentación, por un medio de extracción elegido entre medios que son, al menos, insolubles en el medio de fermentación,
- b) recoger, fuera del reactor de fermentación, las moléculas de ácidos grasos volátiles (AGV) una vez extraídas,
- 40 - c) sintetizar, por halogenación, a partir de un tipo de ácido graso volátil (AGV) seleccionado entre los ácidos grasos volátiles recogidos en la etapa b) y definidos según el tipo de PHA deseado, un ácido α -halogenado dado,
- d) sintetizar, a partir de este ácido α -halogenado, moléculas de un α -hidroxiácido dado por reacción con una base, y
- e) polimerizar a partir del α -hidroxiácido obtenido un polihidroxialcanoato (PHA) definido.

45 Por tanto, dicho procedimiento permite acoplar una fase de producción continua de precursores por microorganismos con una fase de síntesis realizada sin fermentación, lo que permite un fácil control de los diferentes parámetros, permitiendo una mayor variabilidad en el tipo de polihidroxialcanoatos (PHA) producidos.

Dicho procedimiento permite disponer, en continuo, precursores, a saber, ácidos grasos volátiles, conservando mientras la capacidad de producción de los microorganismos presentes en el biorreactor.

50 En efecto, las etapas a) y b) de extracción y recogida permiten no solo extraer y recoger en continuo las moléculas de ácidos grasos volátiles producidas en el reactor de fermentación, sino igualmente preservar los microorganismos responsables de esta producción. En efecto la extracción y de hecho la recogida, se efectúan en condiciones al menos no letales para la totalidad de los microorganismos, es decir, en las condiciones de extracción y recogida biocompatibles, debido a que la extracción mantiene la actividad de los microorganismos y que la recogida se efectúa fuera del reactor de fermentación.

De esta manera, se eliminan los problemas relacionados con la acumulación de metabolitos en el reactor de fermentación, por ejemplo, de la acidificación del medio de fermentación por acumulación de ácidos grasos volátiles producidos que son dañinos para los microorganismos. Se mantienen a un nivel alto, próximo al nivel inicial, la cantidad y actividad de los microorganismos, a lo largo del ciclo de fermentación.

5 Al disponer de una producción continua y regular de AGV, se tiene una fuente de precursores variados fácilmente utilizable y de manera rápida. En el procedimiento objeto de la invención, esta utilización se realiza, a partir de la etapa c), por síntesis química y, por tanto, en condiciones fácilmente controlables y modificables, ofreciendo además una gran variabilidad en el tipo de moléculas sintetizadas. En efecto, durante la etapa c), según el AGV retenido para efectuar la halogenación, se obtiene un tipo dado de ácido α -halogenado y, por tanto, posteriormente, un tipo
10 definido de α -hidroxiácidos y por tanto un tipo dado de α -PHA. La invención permite igualmente combinar varios α -hidroxiácidos así obtenidos para producir heteropolímeros durante la última etapa del procedimiento.

Existen varios tipos de PHA de interés para una utilización industrial, cosmética, médica, alimentaria o de otro tipo. Como ejemplos, se pueden citar polihidroxibutirato o PHB, poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) o PHBV. Se puede citar igualmente, entre los tipos de PHA, la producción de poli(ácido glicólico) o PGA o poli(ácido láctico) o
15 PLA, sabiendo que como, por el procedimiento conocido del estado de la técnica, no es posible producir directamente el PLA, este último debe ser polimerizado a partir de una producción por fermentación de ácido láctico.

En otras palabras, gracias a la invención, se puede realizar la síntesis de varios tipos de PHA, a saber, de tipos homo-, co- o hetero-polímeros, de manera regular y controlada, a partir de un sustrato de origen biológico, asociando una producción por vía biológica con una producción por vía química.

20 Dicho procedimiento permite, durante la fase de fermentación anaerobia, utilizar biomasa fermentable. Por biomasa fermentable, se designa en la presente memoria un sustrato orgánico, ventajosamente no alimentario, obtenido a partir de residuos, subproductos y coproductos formados de materias orgánicas, es decir de la biomasa, procedente de las actividades humanas, bien sean domésticas, industriales, agrícolas, forestales, acuícolas, agroindustriales, procedente de la ganadería u otros. Como ejemplo no limitativo, se puede citar, como sustrato orgánico los
25 estiércoles, la fracción orgánica de los desechos domésticos, coproductos de matadero, residuos celulósicos o lignocelulósicos procedentes de la agroindustria, tales como los que resultan de la transformación de la caña de azúcar (bagazo), del girasol o de la soja.

Por fermentación anaerobia se entiende una fermentación realizada en condiciones anaerobias por microorganismos, eucariotas o procariotas, tales como bacterias, hongos, algas o levaduras.

30 Según aspectos ventajosos, pero no obligatorios, de la invención, dicho procedimiento puede comprender una o varias de las siguientes características:

- En la etapa c), el compuesto halogenado usado es bromo molecular (Br_2) (en lo sucesivo abreviadamente dibromo).

- En la etapa c), el compuesto halogenado usado es diferente a dibromo.

35 - En la etapa c), se utiliza el anhídrido acético en un porcentaje molar con relación al ácido graso volátil próximo al 12%.

- En la etapa c), se utiliza un anhídrido correspondiente al ácido graso volátil (AGV) que se ha de halogenar.

- En la etapa c), la temperatura a la que se realiza la reacción de bromación es inferior de 20°C a 40°C a la temperatura de ebullición del ácido graso volátil.

40 - En la etapa d), la base utilizada es sosa.

- En la etapa d), la sosa está en cantidad equimolar con el ácido α -halogenado.

- En la etapa d), la reacción del ácido α -halogenado con la sosa se realiza entre 20°C y 120°C , ventajosamente entre 50°C y 90°C .

45 - En la etapa d), la reacción del ácido α -halogenado con la sosa es óptima para una temperatura próxima a 50°C si el ácido α -halogenado tiene al menos cuatro carbonos y para una temperatura próxima a 90°C si el ácido halogenado tiene menos de cuatro carbonos.

La invención se comprenderá mejor y surgirán más claramente otras ventajas de ella, con la lectura de la descripción de varios modos de realización de la invención, dada como ejemplo no limitativo.

50 Las diferentes etapas del procedimiento se describen ahora con referencia a varios modos de realización, entendiéndose que no se detallan las etapas conocidas por sí mismas.

En primer lugar, el sustrato utilizado ventajosamente no ha sido tratado, es decir, que no se ha sometido a ningún

- tratamiento previo fisicoquímico ni enzimático. Este sustrato está constituido principalmente por biomasa fermentable. Como ejemplo complementario no limitativo, se pueden citar residuos agrícolas o vegetales (paja, bagazo, residuos de maíz, hierbas, madera, hierba cortada), residuos de la industria papelera (cartón, papel), residuos agroalimentarios, residuos de mataderos, la fracción orgánica de los desechos domésticos, efluentes de ganadería (estiércoles, purines, excrementos), algas, residuos de acuicultura, residuos de actividades forestales o incluso coproductos fermentables de la industria cosmética. Algunos sustratos contienen moléculas orgánicas, tales como ácidos orgánicos, que no influirán, o lo harán de manera marginal, sobre el procedimiento de fermentación. En cambio, estas moléculas se pueden encontrar en el medio de fermentación y participar, por ejemplo, en la producción de moléculas orgánicas finales definidas.
- 5 Cabe recordar y de manera conocida, que el sustrato se introduce en un reactor de fermentación, conocido en sí mismo y dimensionado para la producción deseada, ya sea a escala de laboratorio para efectuar ensayos o a escala industrial en el caso de una producción. En otras palabras, el reactor de fermentación o biorreactor tiene un volumen que varía desde algunos litros hasta varios cientos de metros cúbicos, según las necesidades.
- 10 Los microorganismos se introducen, de modo ventajoso, inicialmente en el reactor de fermentación, en una cantidad suficiente para que comience la fermentación. Los microorganismos se inoculan ventajosamente en forma de un consorcio. Por el término consorcio se designa una mezcla de microorganismos, eucariotas y procariotas, ya sean bacterias, levaduras, hongos o algas. Estos diferentes microorganismos provienen esencialmente de ecosistemas naturales, ventajosa pero no exclusivamente, de ecosistemas anaerobios tales como, a modo de ejemplo no limitativo, la zona anaerobia de medios acuáticos, tal como la zona anóxica de ciertos lagos, suelos, marismas, lodos de depuradora, panza de rumiantes o intestino de termitas. Conviene tener en cuenta que la distribución cualitativa y cuantitativa de los diferentes tipos y especies de microorganismos en el consorcio no se conoce exactamente y, sobre todo, puede variar en proporciones importantes. Resulta que esta diversidad cualitativa y cuantitativa aporta sorprendentemente una robustez y una adaptabilidad de los microorganismos que permite asegurar una utilización óptima de los sustratos, independientemente de la composición de estos y en condiciones de fermentación variables.
- 15 20 Además, debido a que el sustrato se utiliza tal cual, es decir, que no se esteriliza o, más generalmente, que no está desprovisto de los microorganismos que contiene previamente a su introducción en el biorreactor, resulta que los microorganismos endémicos del sustrato están, de hecho, incorporados en el consorcio o al menos asociados a este último en el biorreactor.
- 25 Además, la fermentación tiene lugar en condiciones anaerobias, más precisamente cuando el potencial redox es inferior a -300 mV, ventajosamente comprendido entre -550 mV y -400 mV, y cuando el pH es inferior a 8, preferiblemente comprendido entre 4 y 7. La fermentación se limita ventajosamente a la producción de metabolitos fermentativos denominados precursores, a saber, ácidos grasos volátiles o AGV que tienen de dos a ocho carbonos, preferiblemente de dos a seis. Se induce así una reacción similar al fenómeno de acidosis encontrado en los rumiantes que tienen todos una producción de metano próxima a cero. El metano es generalmente uno de los metabolitos fermentativos finales obtenidos durante una fermentación anaerobia por microorganismos procedentes de los ecosistemas naturales.
- 30 35 La fermentación conduce, en un primer momento, a la formación de ácidos grasos volátiles que tienen principalmente, de dos a cuatro carbonos, tales como, por ejemplo, ácido acético, ácido propiónico y ácido butírico. Se obtienen también, en cantidad menor, ácidos grasos volátiles de cadena larga, es decir superior a cuatro carbonos, tales como los ácidos valérico y caproico, heptanoico u octanoico. Prosiguiendo la fermentación y/o aumentando la cantidad de microorganismos en el biorreactor, si es necesario con microorganismos seleccionados, es posible favorecer la producción de AGV de cadena carbonada larga, es decir superior a cuatro carbonos.
- 40 En otras palabras, los ácidos grasos volátiles producidos en cantidad durante la fermentación son esencialmente ácidos grasos volátiles de dos a seis carbonos.
- 45 La fermentación se realiza, en cualquier caso, para asegurar la producción de AGV en fase líquida. Típicamente, el período de fermentación está comprendido entre 1 y 7 días, preferiblemente entre 2 y 4 días. La concentración de metabolitos obtenida en el medio de fermentación al final de este período es variable, pero, para los ácidos grasos volátiles, es generalmente del orden de 10 a 20 g/L, dependiendo de los ácidos grasos volátiles, entendiéndose que en ciertas condiciones puede ser superior a 35 g/L, por ejemplo, próxima a 50 g/L. Al final de la etapa de fermentación, el medio de fermentación está a un pH ácido, que generalmente está comprendido entre 4 y 6, debido a la presencia de ácidos grasos volátiles en el medio de fermentación.
- 50 Cuando la producción de AGV alcanza una cantidad definida, generalmente en la fase de régimen permanente de la fermentación, se inicia la etapa a) de extracción de las moléculas. Preferible pero no obligatoriamente, esta cantidad definida de AGV corresponde a una ralentización del crecimiento de los microorganismos, es decir en la proximidad de un umbral de inhibición de los microorganismos.
- 55 El medio de extracción se selecciona entre los medios de extracción, líquido o sólido, que son al menos insolubles en el medio de fermentación. Cuando el medio de extracción es líquido, es decir cuando se trata de un disolvente, preferiblemente la densidad del disolvente es inferior a la del medio de fermentación.

- De manera más precisa, la extracción se realiza con un medio de extracción, sólido o líquido, cuyas condiciones de implementación permiten conservar la actividad y/o el crecimiento de microorganismos en las condiciones de fermentación que reinan en el biorreactor y que se definen para realizar la fermentación. Las moléculas de AGV son extraídas preferiblemente por familias moleculares y luego separadas ventajosamente de manera individual por técnicas conocidas por sí mismas.
- 5
- Cuando se extraen del medio de fermentación moléculas tales como los ácidos grasos volátiles, de hecho, se reduce la acidificación del medio de fermentación por estos ácidos. Por tanto, la fermentación, y por consiguiente la producción de metabolitos, se prosigue en condiciones similares a las condiciones iniciales, permaneciendo poco ácido el medio de fermentación.
- 10
- La extracción se realiza ventajosamente en continuo o al menos de manera secuencial, por ejemplo, con una extracción cada 12 horas. En otras palabras, es posible proseguir la fermentación extrayendo mientras los metabolitos producidos, bien a medida que se producen o bien de manera regular.
- La extracción líquido-líquido con disolventes orgánicos como medio de extracción, es el modo de extracción, preferible pero no exclusivamente, utilizado.
- 15
- En un modo de realización, la extracción no se lleva a cabo en un órgano distinto del reactor de fermentación sino directamente en éste. Siendo el disolvente introducido, por ejemplo, por un dispositivo de tipo burbujeador situado en la parte inferior del reactor. Alternativamente, se acopla un órgano de extracción al reactor, disponiendo una comunicación con el medio de fermentación.
- 20
- Al final de la extracción, se realiza la etapa b) de recogida. Durante esta etapa, los AGV se recogen a partir de la fase orgánica por técnicas conocidas por sí mismas, tales como destilación o evaporación.
- La recogida se efectúa bien en mezcla de los AGV o bien por tipo de AGV. Se entiende que la elección del AGV o de la mezcla de AGV venga determinada por el tipo de molécula(s) final(es) deseada(s). Para ello, se adaptan las condiciones de recogida, típicamente los parámetros de evaporación o destilación.
- 25
- Una vez realizado esta etapa de recogida, se efectúa la etapa c) siguiente. Esta se efectúa, ventajosamente pero no exclusivamente, a la finalización de la etapa de recogida. Alternativamente, se realiza en otro momento y/u otro lugar, siendo transportados y/o almacenados los AGV producidos, según las técnicas conocidas *per se*.
- 30
- Esta etapa de halogenación consiste en hacer que un halógeno reaccione con un AGV con el fin de producir un ácido α -halogenado, que es un tipo de molécula muy reactiva y por tanto particularmente interesante para producir otras moléculas. Dicha reacción, conocida por sí misma, se efectúa por adición de bromo, de manera preferida, entendiéndose que se pueden utilizar otros halógenos, a saber, cloro, flúor o yodo, o moléculas halogenadas, tales como trihaluros de fósforo, ácidos halogenados o haluros de acilo.
- 35
- Se eligió el dibromo porque un α -haloácido bromado es más reactivo que el α -haloácido clorado correspondiente, siendo más fácil romper un enlace carbono-bromo que un enlace carbono-cloro. Además, el dibromo es más fácil de manipular debido a su forma líquida.
- 40
- Para realizar la síntesis del ácido α -bromado, se mantuvo la vía que utiliza un anhídrido, en la presente invención anhídrido acético y piridina. Se sabe que son conocidas *per se* otras vías de síntesis, por ejemplo, con ácido polifosfórico o trihaluros de fósforo. Se realizaron ensayos con ácido polifosfórico, pero los resultados no fueron concluyentes, entre otras cosas debido a la alta viscosidad de este compuesto, lo que dificulta su manipulación.
- La sociedad solicitante ha realizado igualmente ensayos de cloración para la síntesis de ácidos α -clorados, por ejemplo, con ácido tricloroisocianúrico. Los resultados obtenidos son inferiores, en términos de rendimiento y facilidad de realización, a los obtenidos con el dibromo.
- 45
- La vía de síntesis que utiliza un anhídrido correspondiente al ácido graso volátil que se ha de halogenar es interesante y permite obtener un ácido α -halogenado, en la presente invención un ácido α -bromado, de un tipo dado. La utilización de anhídrido acético con otros AGV y/o con una mezcla de AGV de dos a seis carbonos permite obtener una mezcla de ácidos α -halogenados de dos a seis carbonos.
- 50
- Ensayos que emplean ácido acético (AGV de dos carbonos), ácido propiónico (AGV de tres carbonos), ácido butírico (AGV de cuatro carbonos), ácido caproico (AGV de seis carbonos) así como una mezcla de AGV de dos a seis carbonos se realizaron variando la cantidad de anhídrido acético, así como otros parámetros, tales como la temperatura.
- Durante los diferentes ensayos, se sigue un protocolo. Se trata, en fase preliminar, de calentar a reflujo una mezcla inicial de AGV, anhídrido acético y piridina. A continuación, durante la bromación propiamente dicha, el dibromo se añade lentamente, durante varias horas, a una temperatura inferior a la temperatura de ebullición de la mezcla, una vez añadido el dibromo, la mezcla se lleva de nuevo a reflujo antes de ser enfriada. Al final de la reacción, ventajosamente, se añade agua para destruir el anhídrido presente. A continuación, el ácido α -bromado se extrae

por diferentes métodos, según el ácido. Se trata, por ejemplo, de destilación o extracción por separación.

5 La temperatura inicial, para llevar la mezcla a reflujo, está comprendida entre 120°C, para los AGV de dos carbonos y 200°C, para los AGV de seis carbonos. La temperatura de bromación varía de 80°C a 180°C, dependiendo de si los AGV tienen de dos a seis carbonos. El tiempo de reacción de bromación, por tanto, de hecho, el tiempo de adición del dibromo, varía de aproximadamente una hora para los AGV de seis carbonos a aproximadamente cuatro horas para los AGV de dos carbonos.

Se efectuaron ensayos de bromación de ácidos grasos volátiles de dos, tres, cuatro, seis carbonos, así como un ensayo con una mezcla de ácidos grasos volátiles:

Ácido acético (C2): 0,53 mol

10 Ácido propiónico (C3): 0,53 mol

Ácido butírico (C4): 0,53 mol

Ácido caproico (C6): 0,24 mol

Mezcla de AGV de C2 a C6: 0,54 mol.

15 La cantidad de dibromo añadida es 0,21 mol o 0,11 mol, de tal suerte que el ácido graso volátil esté en exceso. Ventajosamente, la sociedad solicitante ha observado que es óptima una relación molar de 2:1 a favor de AGV.

La cantidad de anhídrido añadida es, para cada ácido, 0,06 mol para un ensayo y 0,03 mol para otro ensayo. La mezcla de AGV comprende los ácidos acético (C2), propiónico (C3), butírico (C4), valérico (C5) y caproico (C6).

20 Las temperaturas de reflujo, durante la fase preliminar, varían según el AGV: 120°C para el ácido acético; 120°C y 140°C para los ensayos con ácido propiónico; 150°C y 160°C para el ácido butírico; 200°C para el ácido caproico y 180°C para la mezcla.

Las temperaturas de bromación para los diferentes ensayos con cada ácido son inferiores de 10°C a 50°C, y ventajosamente de 20°C a 40°C, a las temperaturas de reflujo, por tanto de ebullición del ácido graso volátil.

Los rendimientos y purezas de los ácidos α -bromados obtenidos al final de los diferentes ensayos se recogen a continuación en la tabla 1. Los AGV se designan, por simplificación, por el número de carbonos.

25

Tabla 1

Ácidos	Cantidad de anhídrido (mol)	Tiempo de bromación (h)	Temperatura de reflujo (°C)	Temperatura de bromación (°C)	Rendimiento (%)	Pureza (%)
C2	0,06	2,2	120	100	87	98
C2	0,03	4	120	90	80	93
C3	0,06	3	120	80 a 110	77	80
C3	0,03	3	140	125	100	93
C4	0,06	1,25	160	140	80	95
C4	0,03	3	150	110 a 140	100	96
C6	0,03	0,92	200	150	100	NC
Mezcla	0,06	1,5	180	130	100	NC

El análisis y los cálculos de rendimiento se realizaron por técnicas analíticas conocidas por sí mismas, a saber, por RMN (Resonancia Magnética Nuclear) y por HPLC (Cromatografía de Líquidos de Alto Rendimiento). Los rendimientos se definen con relación a la cantidad de AGV consumida.

30 La sociedad solicitante ha observado que la velocidad de reacción, ilustrada por la decoloración de la mezcla de reacción después de añadir el dibromo, es más rápida cuanto más importante es la cantidad de anhídrido, afectando poco a la pureza. Sin embargo, conviene que la temperatura de las dos etapas, preliminar y de bromación, sea óptima. Para esto, la sociedad solicitante ha observado que es necesaria una temperatura de bromación inferior a la temperatura de ebullición del ácido graso volátil, sin estar demasiado alejada de esta temperatura.

35 Los diferentes ensayos han permitido definir que una temperatura de bromación inferior de aproximadamente 10°C a 50°C a la temperatura de ebullición del ácido graso volátil y, ventajosamente, inferior a 20°C permitía, siendo idéntica

cualquier otra condición, obtener un rendimiento óptimo, típicamente entre 60% y 100%, con un tiempo de reacción de 1 h a 4 h.

5 En cuanto a la función del anhídrido acético, en vista de los resultados de la tabla, parece que el porcentaje molar de anhídrido con relación al AGV debe estar próximo al 12% para una reacción de bromación óptima, entendiéndose que es aceptable un porcentaje comprendido entre 5% y 20%.

A partir de los ácidos α -bromados obtenidos, o más precisamente a partir de un ácido α -bromado dado, se realiza la síntesis, durante la etapa d), de un ácido α -hidroxilado, igualmente denominado α -hidroxiácido, dado. Para ello se añade una base. Ventajosa pero no exclusivamente, se trata de sosa.

10 La sociedad solicitante efectuó los ensayos sustituyendo la sosa (NaOH) en los α -bromoácidos, a saber, en ácido bromoacético, ácido α -bromopropiónico, ácido α -bromobutírico, en ácido α -bromocaproico y en una mezcla de α -bromoácidos que tienen de dos a seis carbonos. Dicha sustitución permite la obtención de ácidos α -hidroxilados que tienen una cadena carbonada de dos, tres, cuatro, cinco o seis carbonos respectivamente, es decir ácido glicólico, ácido láctico, ácido α -hidroxibutírico, ácido α -hidroxivalérico o ácido α -hidroxicaproico.

15 Estos ácidos α -hidroxilados se encuentran entre los más utilizados para, después de polimerización, producir cosméticos o envases para alimentos. Se entiende fácilmente que el procedimiento objeto de la invención permite la producción de otros tipos de ácidos que permiten la polimerización de otros tipos de PHA. Como ejemplo, se puede citar el ácido α -hidroxidecanoico.

20 Para los diferentes ensayos, el protocolo consistió en llevar a reflujo una mezcla equimolar de sosa y ácido α -bromado durante un período de una a dos horas. La temperatura de calentamiento variaba de 80°C a 120°C. La toma de muestras a intervalos regulares permitió mostrar que el rendimiento está comprendido entre 60% y 100% y, ventajosamente entre 80% y 100%, para ácidos que tienen al menos tres carbonos.

25 Igualmente parece que el rendimiento óptimo se alcanza durante la subida progresiva de la temperatura para los compuestos que tienen más de cuatro carbonos. La sociedad solicitante ha observado así que el rendimiento es óptimo cuando la temperatura permanece inferior a una temperatura a partir de la cual existe un comienzo de degradación del ácido α -hidroxilado, siendo de hecho esta temperatura inferior a la temperatura de ebullición del ácido α -bromado.

En particular, la sociedad solicitante ha observado, sorprendentemente, que la temperatura a la que se alcanza el rendimiento óptimo está comprendida entre 20°C y 120°C, ventajosamente entre 50°C y 90°C.

30 La sociedad solicitante ha observado principalmente que, de forma inesperada, la temperatura a la que se alcanza el rendimiento óptimo está próxima a 50°C para los ácidos α -bromados que tienen al menos cuatro carbonos y próxima a 90°C para los ácidos α -bromados que tienen menos de cuatro carbonos, entendiéndose que, para los ácidos α -hidroxilados de C2 y C3, una temperatura superior a 100°C induce una degradación del compuesto.

35 En efecto, una vez alcanzado el rendimiento óptimo, un alargamiento del tiempo de reacción no proporciona más que una ganancia mínima, por ejemplo, una ganancia del 4% del rendimiento para un tiempo de reacción de dos horas en lugar de una hora para un ácido α -bromado de cuatro carbonos.

La tabla 2 siguiente muestra algunos de los ensayos efectuados.

Tabla 2

Halo-ácidos	Moles de ácido	Moles de NaOH	Temperatura de calentamiento (°C)	Tiempo de reflujo (h)	Rendimiento (%)
BrC2	0,05	0,05	110-120	2	80
BrC2	0,05	0,05	110-120	2	85
BrC3	0,05	0,05	110-120	2	80
BrC4	0,05	0,05	110-120	2	100
BrC4	0,05	0,05	110-120	1	96
BrC6+BrC2	0,041+0,0019	0,043	100	1	95
BrC3+BrC2	0,05+0,014	0,064	100	2	62
Mezcla BrC2-BrC6	0,042	0,042	80	2	83

El análisis y los cálculos de rendimiento se realizaron por las técnicas analíticas de RMN y HPLC, ya citadas. Los rendimientos se definen con relación a la cantidad de ácido halogenado inicial.

5 La última etapa del procedimiento consiste en polimerizar el polihidroxialcanoato o PHA correspondiente a partir del α -hidroxiácido obtenido. Como ejemplo, se puede citar el poli(ácido láctico) o PLA, que se utiliza en envases para alimentos, el poli(ácido glicólico) o PGA utilizado en el campo médico como material de sutura. El PLA procede del ácido láctico obtenido a partir del ácido α -bromopropiónico. El PGA procede del ácido glicólico obtenido a partir del ácido bromoacético.

10 Esta polimerización, conocida por sí misma, se efectúa ventajosamente por tres vías: por apertura del ciclo (*Ring-Opening Polymerization*), por polimerización en fase sólida (*Solid State Polymerization*) o por una policondensación directa (*direct polycondensation*). Esta polimerización va seguida por una recuperación del PHA conocida *per se*.

REIVINDICACIONES

- 1.- Procedimiento para producir polihidroxialcanoatos o PHA a partir de moléculas de ácidos grasos volátiles (AGV), denominados precursores, producidos por fermentación anaerobia a partir de biomasa fermentable, caracterizado por que comprende al menos las siguientes etapas:
- 5 - a) extraer las moléculas de ácidos grasos volátiles (AGV), sin interrupción de la fermentación, por un medio de extracción elegido entre los medios que son, al menos, insolubles en el medio de fermentación,
- b) recoger, fuera del reactor de fermentación, las moléculas de ácidos grasos volátiles (AGV) una vez extraídas,
- c) sintetizar, por halogenación, a partir de un tipo de ácido graso volátil (AGV) seleccionado entre los ácidos grasos volátiles recogidos en la etapa b) y definidos según el tipo de PHA deseado, un ácido α -halogenado dado,
- 10 - d) sintetizar, a partir de este ácido α -halogenado, moléculas de un α -hidroxiácido dado por reacción con una base, y
- e) polimerizar a partir del α -hidroxiácido obtenido un polihidroxialcanoato (PHA) definido.
- 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que, en la etapa c), el compuesto halogenado utilizado es dibromo.
- 15 3.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que, en la etapa c), el compuesto halogenado utilizado es diferente del dibromo.
- 4.- Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, caracterizado por que en la etapa c), se utiliza anhídrido acético en un porcentaje molar con relación al ácido graso volátil próximo al 12%.
- 20 5.- Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, caracterizado por que en la etapa c), se utiliza un anhídrido correspondiente al ácido graso volátil (AGV) que se ha de halogenar.
- 6.- Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que en la etapa c), la temperatura a la que se realiza la reacción de bromación es inferior de 20°C a 40°C a la temperatura de ebullición del ácido graso volátil.
- 25 7.- Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que, en la etapa d), la base utilizada es sosa.
- 8.- Procedimiento según la reivindicación 7, caracterizado por que, en la etapa d), la sosa está en una cantidad equimolar con el ácido α -halogenado.
- 9.- Procedimiento según la reivindicación 7 u 8, caracterizado por que en la etapa d), la reacción del ácido α -halogenado con la sosa se realiza entre 20°C y 120°C, ventajosamente entre 50°C y 90°C.
- 30 10.- Procedimiento según la reivindicación 9, caracterizado por que en la etapa d), la reacción del ácido α -halogenado con la sosa es óptima para una temperatura próxima a 50°C si el ácido α -halogenado tiene al menos cuatro carbonos y para una temperatura próxima a 90°C si el ácido α -halogenado tiene menos de cuatro carbonos.