

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 776 149**

51 Int. Cl.:

C12P 7/62 (2006.01)

C08G 63/90 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.07.2014 PCT/IB2014/063475**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **05.02.2015 WO15015395**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.07.2014 E 14759325 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.12.2019 EP 3027761**

54 Título: **Proceso para recuperar y purificar polihidroxicanoatos a partir de un cultivo celular**

30 Prioridad:

30.07.2013 IT MI20131276

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

29.07.2020

73 Titular/es:

**BIO-ON S.P.A. (100.0%)
Via Dante Alighieri 7/B
40016 SAN GIORGIO DI PIANO (BO), IT**

72 Inventor/es:

BEGOTTI, SIMONE

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 776 149 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

Proceso para recuperar y purificar polihidroxicanoatos a partir de un cultivo celular

5 La presente invención se refiere a un proceso para recuperar y purificar polihidroxicanoatos a partir de un cultivo celular.

10 Los polihidroxicanoatos (PHA) son homopolímeros o copolímeros de hidroxicanoato, tales como 3-hidroxiбутирато (3HB), 3-hidroxiуалерато (3HV), 4-hidroxiуалерато (4HV) y 3-hidroxiуексаноато (3HH). Son sintetizados y acumulados por diversos microorganismos, en particular bacterias, como reserva de carbono y energía para el metabolismo celular. Los PHA se puede producir por fermentación de cepas de bacterias adecuadas en un sustrato orgánico, generalmente a base de carbohidratos, alcoholes y ácidos orgánicos. Los biopolíesteres son sintetizados y almacenados por las células de las que luego deben ser extraídos para obtener el material polimérico con un grado suficiente de pureza.

15 Con respecto a los polímeros sintéticos y a otros biopolímeros obtenidos de fuentes renovables (por ejemplo, ácido poliláctico (PLA)), los PHA tienen numerosas ventajas, en particular en términos de biodegradabilidad, reciclabilidad e hidrofobicidad, que hacen que tales productos sean particularmente prometedores como sustitutos biodegradables de polímeros de origen petroquímico.

20 El proceso para producir PHA, después de la etapa de fermentación en la que las células bacterianas sintetizan el polímero y lo acumulan dentro de sí mismas, requiere una etapa para eliminar los PHA de las células en las que las paredes celulares se destruyen y se separan de los PHA, y una etapa para purificar y blanquear los PHA.

25 Un método para eliminar los PHA de las células que lo produjeron incluye el uso de disolventes orgánicos que son capaces de solubilizar el polímero, como se describe, por ejemplo, en la solicitud de patente EP 1.739.182 A1. Dicho método tiene numerosos inconvenientes, en particular, debido a la alta viscosidad de las soluciones de PHA que, para ser procesadas, deben diluirse con grandes cantidades de solvente, con problemas evidentes en términos de su recuperación y de los costos del proceso. Además, los PHA recuperados de este modo debe separarse del disolvente orgánico, por ejemplo mediante precipitación añadiendo otro disolvente en el que los PHA son poco solubles. Esto hace que el proceso con disolventes sea extremadamente costoso y problemático en lo que respecta al medio ambiente.

35 La patente de Estados Unidos No. 7.314.740 B2 describe un proceso para producir PHA que comprende llevar a cabo una etapa para romper las membranas celulares que contienen los PHA mediante la adición de una sustancia alcalina, por ejemplo una base fuerte, para obtener un valor de pH de 9 a 13,5 y simultáneamente una acción mecánica sobre la suspensión llevada a cabo, por ejemplo, a través de un dispositivo de emulsiónamiento o un homogeneizador de alta presión. El polímero se separa luego por centrifugación.

40 La patente de Estados Unidos No. 7.393.668 B2 se refiere a un método para recuperar PHA de células que lo produjeron mediante: (a) la adición de un producto alcalino bajo agitación y acción mecánica para romper las membranas celulares con la solubilización del material biológico, y la posterior separación de los PHA; y (b) tratamiento de los PHA así obtenidos con una enzima y/o un tensioactivo para solubilizar las impurezas contenidas en los PHA, y posterior lavado de los PHA con un disolvente hidrofílico y/o agua. En particular, para evitar una reducción en el peso molecular de los PHA, la etapa de ruptura mecánica de las membranas celulares se realiza antes de agregar el producto alcalino, ya que se cree que la acción mecánica llevada a cabo después de la etapa de alcalinización puede conducir a una sustancial e indeseada reducción en el peso molecular del polímero. La rotura de la célula se puede obtener por medio de un homogeneizador de alta presión, un dispositivo de ultrasonido, un dispositivo de emulsiónamiento, un molino, etc.

50 La patente de Estados Unidos No. 7.514.525 describe un método para recuperar, purificar y aislar PHA de una masa celular que lo contiene, que comprende: (a) solubilizar la masa celular diferente de los PHA en una solución ácida, formando una suspensión de gránulos de PHA parcialmente cristalizados; (b) ajustar el pH de la suspensión a un valor de 7 a 11 y separar los PHA sólidos de la masa celular disuelta; (c) resuspender los PHA sólidos en una solución de blanqueo; (d) secar los PHA sólidos así obtenidos. La solubilización de acuerdo con la etapa (a) se lleva a cabo a alta temperatura y durante largos períodos de tiempo, en particular a 80 °C - 130 °C, preferiblemente 100 °C - 110 °C, durante un tiempo de 30 minutos a 4 horas, preferiblemente 2 horas. La separación de los PHA sólidos de la masa celular disuelta se obtiene por centrifugación prolongada a alta velocidad (4.000 g durante 20 minutos).

60 La presente invención tiene principalmente el propósito de proporcionar un proceso para recuperar y purificar PHA a partir de una masa celular que los contiene que puede llevarse a cabo continuamente, es decir, sin etapas por lotes como, por ejemplo, etapas de centrifugación para separar los PHA de una suspensión, que generalmente son complejos de llevar a cabo en grandes volúmenes, requieren el uso de maquinaria costosa y reducen inevitablemente la productividad del proceso. Otro objetivo de la presente invención es llevar a cabo el proceso sin usar disolventes orgánicos, que, como se ilustra más arriba, además de conducir a dificultades considerables para realizar el proceso a gran escala, no son deseables desde un punto de vista ecológico. Un objetivo adicional es obtener los PHA en una

65

forma lo más pura posible sin causar una reducción en el peso molecular, lo que tendría consecuencias inevitables en el rendimiento mecánico del material polimérico.

5 El solicitante ahora ha descubierto que estos y otros propósitos, que se ilustrarán con más detalle en el resto de la descripción, se pueden lograr con un proceso como se define en el presente documento más adelante y en las reivindicaciones adjuntas.

10 En un primer aspecto, la presente invención se refiere por lo tanto a un proceso para la recuperación y purificación de polihidroxialcanoatos (PHA) de un cultivo celular, que comprende:

- 10 (a) acidificar el cultivo celular para obtener un valor de pH igual o inferior a 6, y someter dicho cultivo celular a un tratamiento de fraccionamiento celular mediante homogeneización a alta presión a una temperatura de 10 °C a 80 °C, para obtener una suspensión de PHA;
- 15 (b) basificar la suspensión de PHA así obtenida para obtener un valor de pH igual o superior a 8;
- 15 (c) diluir la suspensión de PHA y someterla a filtración tangencial para obtener una suspensión de PHA concentrada como fracción retenida y una fase acuosa como fracción permeada;
- (d) someter la suspensión de PHA a una etapa de blanqueo;
- (e) diluir la suspensión de PHA después de la etapa de blanqueo y someterla a filtración tangencial para obtener una suspensión concentrada y blanqueada de PHA como fracción retenida y una fase acuosa como fracción permeada;
- 20 (f) someter la suspensión concentrada y blanqueada de PHA a secado.

25 El cultivo celular inicial en general proviene de un proceso de fermentación que se lleva a cabo en un sustrato orgánico nutricional por cepas de bacterias que son capaces de producir PHA. Dichas cepas de bacterias se pueden seleccionar, por ejemplo, de los siguientes géneros: *Cupriavidus*, *Azotobacter*, *Alcaligenes*, *Aeromonas*, *Nocardia*, *Ralstonia*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Methylobacterium*, *Bacillus*. Particularmente preferidos son los géneros *Ralstonia*, *Cupriavidus* y *Methylobacterium*, y más específicamente las especies *Ralstonia eutropha*, *Cupriavidus necator* y *Methylobacterium rhodesianum*.

30 El sustrato nutricional puede ser cualquier tipo de sustrato que pueda ser metabolizado por las células bacterianas para producir PHA, que puede seleccionarse de jugos, melazas o pulpas obtenidas, por ejemplo, procesando productos vegetales, tales como fruta, azúcar de remolacha, caña de azúcar, semillas oleaginosas y similares. Tales sustratos, además de carbohidratos y proteínas, en general contienen factores de crecimiento de diversa naturaleza, compuestos que contienen nitrógeno y/o fósforo y otros elementos útiles para el crecimiento celular.

35 Al final de la etapa de fermentación, el cultivo celular posiblemente puede someterse a una etapa de concentración preliminar, con el fin de reducir los volúmenes a tratar en las etapas posteriores. Preferiblemente, la etapa de concentración preliminar conduce a la obtención de una concentración celular de 20 a 800 g/L, más preferiblemente de 40 a 500 g/L. Dicha etapa de concentración puede llevarse a cabo ventajosamente por filtración tangencial, de acuerdo con métodos que son análogos a los descritos posteriormente en relación con la etapa (c).

40 De acuerdo con la etapa (a), el cultivo celular se acidifica para obtener un valor de pH igual o inferior a 6, preferiblemente igual o inferior a 5. La acidificación se obtiene en general mediante la adición de un ácido a temperatura ambiente, en particular una solución acuosa de un ácido inorgánico u orgánico, que se selecciona por ejemplo de: ácido sulfúrico, ácido clorhídrico, ácido fosfórico, ácido nítrico, ácido acético, ácido cítrico o mezclas de los mismos.

45 El cultivo celular así acidificado se somete luego a un tratamiento de fraccionamiento celular que requiere el uso de un homogeneizador de alta presión. Tal proceso puede realizarse continuamente a través del paso del líquido desde una zona de alta presión a una zona de baja presión, para someter las células a un choque mecánico para fragmentar las membranas celulares y liberar su contenido. En general, de acuerdo con técnicas que son bien conocidas por un experto en la materia, el homogeneizador comprende una bomba volumétrica de pistón y una válvula que tiene una geometría ajustable, en la que se genera una presión dinámica en condiciones de flujo continuo.

50 Preferiblemente, en la zona de alta presión, se aplica una presión de 500 bar a 2000 bar, más preferiblemente de 500 bar a 1500 bar. En general, el proceso de homogeneización requiere de 1 a 5 pasadas dentro del dispositivo, y el número de pasadas requerido para obtener un grado suficiente de fraccionamiento celular disminuye a medida que aumenta la presión máxima aplicada.

55 Durante el proceso de homogeneización, la acción mecánica ejercida sobre la suspensión de células provoca un aumento de temperatura, que en cualquier caso se mantiene dentro del intervalo de 10 °C a 80 °C, preferiblemente de 20 °C a 50 °C, con el fin de evitar posibles degradaciones de los PHA con la consiguiente disminución del peso molecular promedio.

60 Después de la etapa de homogeneización, la suspensión de PHA se basifica para obtener un valor de pH igual o superior a 8, preferiblemente igual o superior a 9. La etapa de basificación se puede llevar a cabo preferiblemente

ES 2 776 149 T3

agregando una base fuerte, por ejemplo, una solución básica inorgánica fuerte, tal como hidróxido de potasio, hidróxido de sodio o mezclas de los mismos.

5 En una realización preferida, la suspensión de PHA así basificada se trata con al menos un tensioactivo a una temperatura de 10 °C a 80 °C, preferiblemente de 20 °C a 50 °C.

El tensioactivo se agrega preferiblemente en bajas cantidades, por ejemplo de 0,5 a 10 g/L, y tiene principalmente la función de promover la eliminación de los PHA del residuo derivado de la ruptura de la membrana celular.

10 Como tensioactivos, se usan preferiblemente tensioactivos aniónicos, catiónicos o no iónicos. Tales tensioactivos se seleccionan preferiblemente de aquellos que tienen un bajo impacto ambiental, para evitar problemas de eliminación. Ejemplos de tensioactivos aniónicos son: sulfatos de alquilo o alquenilo, bencenosulfonatos de alquilo o alquenilo, éter sulfatos de alquilo o alquenilo, carboxilatos de alquilo o alquenilo, éter carboxilatos de alquilo o alquenilo, y similares. Particularmente preferidos son los sulfatos de alquilo C₁₀-C₁₈.

15 Como tensioactivos catiónicos, es posible usar, por ejemplo, sales de alquiltrimetilamonio o dialquildimetilamonio.

20 Como tensioactivos no iónicos, es posible usar: polioxialquilenos (preferiblemente polioxietileno) alquil o alquenil éteres, polioxialquilenos (preferiblemente polioxietileno) alquil o alquenil feniléteres, copolímeros de polioxietileno/polioxipropileno, y similares.

25 Después del tratamiento de acuerdo con la etapa (b), la suspensión de PHA se diluye, generalmente con agua, para obtener una concentración sólida que es preferiblemente de 10 a 500 g/L, más preferiblemente de 25 a 100 g/L, y luego se somete a filtración tangencial para obtener una suspensión concentrada de PHA como fracción retenida y una fase acuosa como fracción permeada. La filtración tangencial puede llevarse a cabo de acuerdo con métodos conocidos haciendo que la suspensión pase de manera continua a través de al menos un filtro de flujo tangencial, en el que hay al menos una membrana cerámica o polimérica, que tiene una dimensión media de poro preferiblemente de 0,05 µm a 10 µm, más preferiblemente de 0,2 µm a 5 µm. Tal método permite separar la fracción retenida de la fracción permeada haciendo pasar continuamente la suspensión entrante a través de canales, preferiblemente canales tubulares, definidos por la membrana que tiene sustancialmente un desarrollo cilíndrico. Preferiblemente, la suspensión de PHA a someter a filtración tangencial se alimenta a través de dicho al menos un filtro de flujo tangencial con una presión que puede variar preferiblemente de 1 a 10 bar, más preferiblemente de 2 a 6 bar.

35 La dimensión media de las partículas suspendidas de PHA está comprendida en general de 0,3 µm a 2 µm, preferiblemente de 0,5 µm a 1,5 µm. La presencia de partículas con dimensiones tan pequeñas puede conducir a una obstrucción rápida del filtro tangencial debido al llamado "ensuciamiento" de las superficies a través de las cuales fluye la suspensión, lo que conduce a la alteración y reducción de la permeabilidad de la superficie filtrante. Para reducir dicho fenómeno, es preferible mantener un caudal a través del filtro tangencial comprendido entre 2 y 10 m/s, más preferiblemente entre 3 y 8 m/s.

40 La suspensión de PHA concentrada obtenida como fracción retenida de la etapa de filtración tangencial (c) se somete por lo tanto a una etapa de blanqueo, que se puede lograr, por ejemplo, mediante la adición de un agente oxidante, en particular una solución acuosa de hipoclorito (por ejemplo, hipoclorito de sodio) o, preferiblemente, de peróxido de hidrógeno. Una solución particularmente preferida es el peróxido de hidrógeno con una concentración del 10% al 35% en peso. Preferiblemente, la etapa de blanqueo se lleva a cabo a una temperatura de 10 °C a 60 °C.

50 Después del tratamiento de acuerdo con la etapa (d), la suspensión de PHA blanqueada se diluye, en general con agua, para obtener una concentración sólida preferiblemente de 10 g/L a 100 g/L, y luego se somete a filtración tangencial para obtener una suspensión concentrada y blanqueada de PHA como fracción retenida y una fase acuosa como fracción permeada. Tal etapa de filtración tangencial puede llevarse a cabo de manera análoga a la etapa (c) mencionada anteriormente.

55 La suspensión concentrada y blanqueada de PHA luego se seca, de acuerdo con métodos convencionales, en particular a través de un flujo de aire caliente. Para tal fin, es posible usar un secador por aspersión, un secador de lecho fluido y similares.

60 En una realización preferida, la suspensión concentrada y blanqueada de PHA obtenida de la etapa (e) se concentra adicionalmente por filtración ortogonal y luego se alimenta a la etapa de secado (f). De esta forma, se reduce el tiempo necesario para lograr el secado y el consumo relativo de energía. La filtración ortogonal puede ser necesaria en el caso en que se desee obtener una suspensión aún más concentrada con respecto a los límites que se pueden obtener por filtración tangencial.

65 La posible filtración ortogonal de la suspensión de PHA se puede llevar a cabo mediante un filtro de tambor, un filtro giratorio o un filtro de bujía. Dado que las partículas tienen dimensiones pequeñas, para evitar una obstrucción prematura del filtro con la consiguiente detención de la permeación de la fase acuosa (impermeabilización), es preferible agregar al menos un agente floculante a la suspensión concentrada y blanqueada de PHA, preferiblemente

al menos un agente floculante no polimérico, para evitar la contaminación de los PHA finales. Preferiblemente, dicho al menos un agente floculante se selecciona de productos inorgánicos tales como: óxido de calcio, sulfato de aluminio, ácido fosfórico y mezclas de los mismos.

- 5 En lo que respecta a los PHA a los que se puede aplicar el proceso de acuerdo con la presente invención, estos son en general polímeros que contienen unidades repetidas de fórmula:



10 en la que

R₁ se selecciona de: -H, alquilos C₁-C₁₂, cicloalquilos C₄-C₁₆, alquenos C₂-C₁₂, posiblemente sustituidos con al menos un grupo seleccionado de: halógeno (F, Cl, Br), -CN, -OH, -COOH, -OR, -COOR (R = alquilo C₁-C₄, bencilo); n es un número entero de 1 a 6, preferiblemente es 1 o 2.

15 Preferentemente, R₁ es metilo o etilo, y n es 1 o 2.

Los PHA pueden ser homopolímeros, copolímeros o terpolímeros. En el caso de copolímeros o terpolímeros, estos pueden consistir en diferentes unidades repetitivas de fórmula (I), o en al menos una unidad repetitiva de fórmula (I) en combinación con al menos una unidad repetitiva derivada de comonómeros que son capaces de copolimerizar con hidroxialcanoatos, por ejemplo lactonas o lactamas. En este último caso, las unidades repetitivas de fórmula (I) están presentes en una cantidad igual a al menos 10% en moles con respecto al total de moles de unidades repetitivas.

20 Las unidades repetitivas particularmente preferidas de fórmula (I) son las derivadas de: 3-hidroxi butirato, 3-hidroxi valerato, 3-hidroxi hexanoato, 3-hidroxi octanoato, 3-hidroxi undec-10-enoato, 4-hidroxi valerato.

Los PHA particularmente preferidos son: poli-3-hidroxi butirato (PHB), poli-3-hidroxi valerato (PHV), poli-3-hidroxi hexanoato (PHH), poli-3-hidroxi octanoato (PHO), poli(3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi valerato) (PHBV), poli(3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi hexanoato) (PHBH), poli(3-hidroxi butirato-co-4-hidroxi butirato), poli(3-hidroxi octanoato-co-3-hidroxi undec-10-enoato) (PHOU), poli(3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi valerato-co-4-hidroxi valerato) (PHBW), o mezclas de los mismos.

Los siguientes ejemplos de trabajo se proporcionan únicamente para ilustrar la presente invención.

35 Ejemplo 1

Se realizó un proceso de fermentación mediante una cepa de *Ralstonia eutropha* sobre un sustrato orgánico a base de melaza derivado del procesamiento de la remolacha azucarera, para obtener una concentración de células igual a 80 g/L.

40 El caldo de cultivo se concentró mediante un filtro de flujo tangencial que tenía un diámetro de poro (punto de corte) igual a 1,2 μm, para obtener una concentración celular igual a 150 g/L.

45 El cultivo celular así concentrado se añadió a una solución de ácido sulfúrico (concentración 10% en peso), en una cantidad tal como para obtener un valor de pH igual a aproximadamente 4,5.

El cultivo acidificado se introdujo luego en un homogeneizador de alta presión (presión máxima: 1.500 bar), a temperatura ambiente. El proceso de homogeneización se llevó a cabo continuamente con tres pasadas consecutivas dentro del homogeneizador.

50 La suspensión de PHA así obtenida se añadió luego con una solución de hidróxido de sodio (concentración 50% en peso), para obtener un valor de pH igual a aproximadamente 10,0, y luego con una solución acuosa de dodecil sulfato de sodio (4 g de tensioactivo por litro de suspensión), manteniendo la suspensión a temperatura ambiente.

55 La suspensión así tratada se diluyó luego en una relación 1:4 con agua, y luego se sometió a filtración a través de un filtro de flujo tangencial con punto de corte igual a 0,8 μm, para obtener una concentración de sólidos igual a 150 g/L.

La suspensión de PHA concentrada así obtenida se sometió luego a blanqueo mediante la adición de una solución de peróxido de hidrógeno al 30% en peso, en una relación 1:8 con respecto al volumen de la suspensión.

60 Después de diluir con agua en una relación 1:3, la suspensión blanqueada se sometió a una filtración tangencial con un filtro del mismo tipo utilizado después de la etapa de basificación (punto de corte: 0,8 μm). La fracción retenida contenía los gránulos de PHA purificados, mientras que la fracción permeada se usó para las etapas de dilución mencionadas anteriormente.

65 La fracción retenida se sometió a secado a través de un secador por aspersion a 240 °C, para obtener un polvo de PHA con un contenido de agua inferior al 1% en peso.

Ejemplo 2

El mismo caldo de cultivo que en el Ejemplo 1 se trató como sigue para recuperar y purificar los PHA.

El caldo de cultivo se concentró mediante un filtro de flujo tangencial que tenía un punto de corte igual a 0,4 μm , para obtener una concentración celular igual a 250 g/L.

El cultivo celular así concentrado se añadió con una solución de ácido sulfúrico (concentración 30% en peso), en una cantidad tal para obtener un valor de pH igual a aproximadamente 4,5.

El cultivo acidificado se introdujo luego en un homogeneizador de alta presión (presión máxima: 1.000 bar), a temperatura ambiente. El proceso de homogeneización se llevó a cabo continuamente con dos pasadas consecutivas dentro del homogeneizador.

La suspensión de PHA así obtenida se añadió luego con una solución de hidróxido de sodio (concentración 30% en peso), para obtener un valor de pH igual a aproximadamente 9,0, y luego con una solución acuosa de dodecil sulfato de sodio (5 g de tensioactivo por litro de suspensión), manteniendo la suspensión a temperatura ambiente.

La suspensión así tratada se diluyó luego en una relación 1:3 con agua, y luego se sometió a filtración a través de un filtro de flujo tangencial que tiene punto de corte que es igual a 0,4 μm , para obtener una concentración de sólidos que es igual a 150 g/L.

La suspensión de PHA concentrada así obtenida se sometió a blanqueo mediante la adición de una solución de peróxido de hidrógeno al 30% en peso, en una relación 1:4 con respecto al volumen de la suspensión.

Después de diluir con agua en una relación 1:3, la suspensión blanqueada se sometió a filtración tangencial con un filtro del mismo tipo utilizado después de la etapa de basificación (punto de corte: 0,8 μm). La fracción retenida contenía los gránulos de PHA purificados, mientras que la fracción permeada se usó para las etapas de dilución mencionadas anteriormente.

La fracción retenida se sometió a una operación de filtración adicional a través de un filtro de bujía, en el que la suspensión se introdujo con una presión igual a 4,0 bar, a partir de la cual se obtuvieron una fracción permeada acuosa y una suspensión concentrada, siendo sometida esta última luego a secado mediante un secador de lecho fluido a 180 °C, para obtener un polvo de PHA con un contenido de agua inferior al 0,5% en peso.

Ejemplo 3

El ejemplo 1 se repitió en las mismas condiciones a partir de una suspensión de células de 500 L que tenía una concentración de masa seca de 77 g/L y un contenido de PHA igual a 53 g/L. La Tabla 1 muestra las concentraciones en base seca de la masa total y de los PHA medidos en las diversas etapas del proceso, es decir, después del tratamiento con base (suspensión de células tratada) y al final del proceso después del blanqueo y la filtración tangencial (suspensión final de PHA). Los PHA obtenidos se caracterizaron en términos de pureza, peso molecular y rendimiento.

El peso molecular (M_w , peso molecular ponderal medio) se determinó usando el dispositivo GPC-HPLC Breeze 2, Waters, provisto con detectores de índice de refracción y UV-VIS, con columna cromatográfica Mini Mix D (intervalo de peso molecular 200-400.000 Da). La calibración se llevó a cabo utilizando patrones de poliestireno monodisperso (Sigma Aldrich, Milán) que tenían los siguientes pesos moleculares: 2.440 Da, 13.700 Da, 29.300 Da, 50.400 Da, 105.600 Da y 370.000 Da. La velocidad de flujo de la fase móvil fue de 0,3 mL/min, mientras que la concentración de las soluciones inyectadas de cloroformo de PHA fue de aproximadamente 3 mg/mL.

La pureza de PHA se determinó mediante un aparato de HPLC Shimadzu con columna cromatográfica Alltech OA-1000. La velocidad de flujo era de 0,7 mL/min y la fase móvil era una solución acuosa llevada a un pH igual a 2 con ácido sulfúrico. Antes del análisis, la suspensión de PHA se secó para obtener un polvo y luego los PHA se despolimerizaron mediante un proceso de metanólisis en metanol y ácido sulfúrico al 3%, obteniéndose una degradación del polímero en sus monómeros.

Tabla 1

Etapa	Volumen (L)	Concentración en masa seca (g/L)	Concentración de PHA (g/L)	Pureza (%)	Rendimiento (%)	Peso molecular (kDa)
Suspensión inicial de células	500	77,0	53,0	-	100	320

(continuación)

Etapa	Volumen (L)	Concentración en masa seca (g/L)	Concentración de PHA (g/L)	Pureza (%)	Rendimiento (%)	Peso molecular (kDa)
Suspensión de células tratada	372	65,0	59,1	-	83	297
Suspensión final de PHA	285	73,2	72,5	99	78	278

Los datos mostrados en la Tabla 1 destacan que los PHA obtenidos tenía una pureza del 99%, un rendimiento del 78% y un peso molecular de 278 kDa. Los datos mostrados son el resultado de experimentos realizados en 20 muestras, lo que demuestra que son datos repetibles.

Ejemplo 4 (comparación)

A partir de la misma suspensión de células utilizada en el ejemplo 3, se repitió el proceso de recuperación y purificación descrito en el documento WO2011/045625, páginas 6-8. Los PHA así obtenidos se caracterizaron como se describe en el ejemplo 3. Los datos mostrados en la Tabla 2 resaltan que los PHA obtenidos tenían una pureza del 95%, un rendimiento del 59% y un peso molecular de 167 kDa. También en este caso, los datos mostrados son el resultado de experimentos realizados en 20 muestras.

A partir de la comparación de los resultados obtenidos en los ejemplos 3 y 4, es evidente cómo, al partir de la misma suspensión de células que contiene PHA, el método de la invención permite obtener PHA con un mayor grado de pureza, un mayor rendimiento y un mayor peso molecular.

Tabla 2

Etapa	Volumen (L)	Concentración en masa seca (g/L)	Concentración de PHA (g/L)	Pureza (%)	Rendimiento (%)	Peso molecular (kDa)
Suspensión inicial de células	500	77,0	53,0	-	100	320
Suspensión de células tratada	387	52,9	46,6	-	68	187
Suspensión final de PHA	300	54,7	52,1	95	59	167

REIVINDICACIONES

1. Proceso para recuperar y purificar polihidroxicanoatos (PHA) de un cultivo celular, que comprende:
- 5 (a) acidificar el cultivo celular mediante la adición de una solución acuosa de un ácido inorgánico u orgánico seleccionado entre: ácido sulfúrico, ácido clorhídrico, ácido fosfórico, ácido nítrico, ácido acético, ácido cítrico o mezclas de los mismos, para obtener un valor de pH igual o inferior a 6, y someter dicho cultivo celular a un tratamiento de fraccionamiento celular mediante homogeneización a alta presión a una temperatura de 10 °C a 80 °C, para obtener una suspensión de PHA;
- 10 (b) basificar la suspensión de PHA así obtenida para obtener un valor de pH igual o superior a 8;
- (c) diluir la suspensión de PHA y someterla a filtración tangencial para obtener una suspensión concentrada de PHA como fracción retenida y una fase acuosa como fracción permeada;
- (d) someter la suspensión concentrada de PHA a una etapa de blanqueo;
- 15 (e) diluir la suspensión de PHA después de la etapa de blanqueo y someterla a filtración tangencial para obtener una suspensión concentrada y blanqueada de PHA como fracción retenida y una fase acuosa como fracción permeada;
- (f) someter la suspensión concentrada y blanqueada de PHA a secado.
2. Proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el cultivo celular se somete a una etapa preliminar de concentración.
- 20 3. Proceso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la etapa preliminar de concentración conduce a la obtención de una concentración celular de 20 a 800 g/L, preferiblemente de 40 a 500 g/L.
4. Proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que en la etapa (a) el cultivo celular se acidifica para obtener un valor de pH igual o inferior a 5.
- 25 5. Proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que se aplica una presión de 500 bar a 2.000 bar durante la homogeneización, preferiblemente de 500 bar a 1.500.
- 30 6. Proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que en la etapa (b) la suspensión de PHA se basifica para obtener un valor de pH igual o superior a 9.
7. Proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la suspensión de PHA así basificada se trata con al menos un tensioactivo a una temperatura de 10 °C a 80 °C, preferiblemente de 20 °C a 50 °C.
- 35 8. Proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que, después del tratamiento de acuerdo con la etapa (b), la suspensión de PHA se diluye para obtener una concentración sólida de 10 a 500 g/L, preferiblemente de 25 a 100 g/L.
- 40 9. Proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que, en al menos una de las etapas de filtración tangencial, se usa al menos una membrana cerámica o polimérica, que tiene una dimensión media de poro de 0,05 µm a 10 µm, preferiblemente de 0,2 µm a 5 µm.
- 45 10. Proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que, en al menos una de las etapas de filtración tangencial, la suspensión de PHA se alimenta a través de dicho al menos un filtro de flujo tangencial con una presión de 1 a 10 bar, preferiblemente de 2 a 6 bar.
- 50 11. Proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que, en al menos una de las etapas de filtración tangencial, se mantiene una velocidad de flujo comprendida entre 2 y 10 m/s, preferiblemente de 3 a 8 m/s, a través del filtro tangencial.
12. Proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la etapa de blanqueo (d) se lleva a cabo mediante la adición de un agente oxidante.
- 55 13. Proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la etapa de blanqueo (d) se lleva a cabo a una temperatura de 10 °C a 60 °C.
14. Proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que, después del tratamiento de acuerdo con la etapa (d), la suspensión de PHA blanqueada se diluye para obtener una concentración de sólidos de 10 g/L a 100 g/L.
- 60 15. Proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la suspensión concentrada y blanqueada de PHA obtenida de la etapa (e) se concentra adicionalmente por medio de filtración ortogonal y luego se dirige a la etapa de secado (f).
- 65

16. Proceso de acuerdo con la reivindicación 15, en el que la suspensión concentrada y blanqueada de PHA se agrega con al menos un agente floculante y luego se alimenta a la etapa de filtración ortogonal.