

(12)

SOLICITUD de PATENTE

(43) Fecha de publicación: 23/12/2009 (51) Int. Cl: C12P 7/00 (2006.01)
(22) Fecha de presentación: 23/06/2008
(21) Número de solicitud: 2008008292

(71) Solicitante:
**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL I.P.N.
Av. Instituto Politécnico Nacional, Número 2508 07360
Distrito Federal MX**

(72) Inventor(es):
**FERMIN PÉREZ GUEVARA
Paseguana Número 1235, Departamento 4 Distrito
Federal 07360 MX
MA. DEL ROCIO LÓPEZ CUELLAR
JORGE NOEL GRACIDA RODRÍGUEZ**

(74) Representante:
**LUIS ANTONIO CARREÑO SÁNCHEZ.*
Av. Instituto Politécnico Nacional No. 2508,
Edificio Administrativo, 1er. piso, Subdirección de
Vinculación Tecnológica Distrito Federal 07360 MX**

(54) Título: **MÉTODOS PARA LA PRODUCCION DE POLIHIDROXIALCANOATOS (PHA) DE CADENA MEDIA USANDO ACEITE VEGETAL COMO FUENTE DE CARBONO.**

(54) Title: **METHODS FOR PRODUCING MEDIUM CHAIN POLYHYDROXYALKANOATES (PHA) USING VEGETABLE OILS AS CARBON SOURCE.**

(57) Resumen

La presente invención describe métodos eficientes de fermentación de bajo costo para la producción eficiente de poli-3-hidroxicanoatos (PHAs) de cadena media que comprenden el crecimiento de microorganismos productores de PHAs utilizando aceites vegetales como fuente de carbono, ya sea en presencia ó ausencia de sacárido. Los métodos de la invención comprenden producir biomasa en cultivo por lote, posteriormente producir biomasa en lote alimentado mediante la adición de sacárido y una fuente de nitrógeno al medio de cultivo y finalmente producir PHAs mediante la adición de aceite vegetal como fuente de carbono bajo limitación de nitrógeno o fósforo. Mediante el método de la invención, se obtiene al menos un 90% en peso seco de PHAs de cadena media del medio de fermentación, presentando de 5 a 10% de unidades monoméricas de cadena media en su estructura.

(57) Abstract

The present invention describes efficient and low cost fermentation methods for the efficient production of medium chain poli-3-hydroxyalkanoates (PHAs), which comprise the growth of microorganisms producing PHAs using vegetable oils as carbon source, either in the presence or absence of saccharide. The methods of the invention comprise producing biomass in batch culture, subsequently producing biomass in fedbatch culture by means of the addition of saccharide and a nitrogen source to the culture medium and finally producing PHAs by means of the addition of vegetal oil as carbon source with limitation of nitrogen or phosphorus. By means of the method of the invention, at least 90% in dry weight of medium chain PHAs with respect to dry biomass is obtained from the culture medium, presenting from 5 to 10% of medium chain monomeric units in their structure.

Métodos para la producción de polihidroxialcanoatos (PHA) de cadena media usando aceite vegetal como fuente de carbono

Campo de la invención.

- 5 La presente invención se relaciona con métodos biológicos para la producción de plásticos biodegradables, específicamente con métodos de fermentación para la producción de poli-3-hidroxialcanoatos (PHAs) de cadena media mediante el crecimiento de microorganismos usando aceites vegetales como fuente de carbono.

10 Antecedentes de la invención.

El aumento poblacional a nivel mundial ha originado un incremento en la demanda de petróleo provocando un aumento progresivo en su precio originado por la escasez de este recurso en el mercado mundial. La producción de este recurso natural comenzará a disminuir de forma acelerada provocando un grave problema de agotamiento para el año
15 2050. Una cantidad importante de petróleo está destinado a la producción de plásticos, por lo tanto, al haber escasez en las reservas petroleras, también se presentará escasez en éstos.

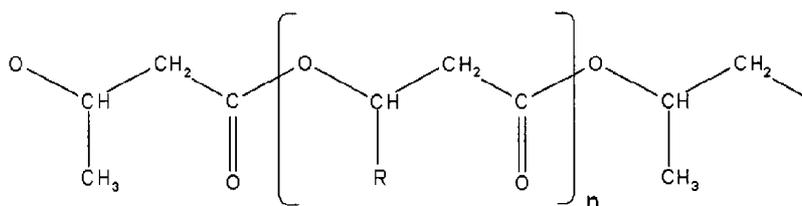
Los plásticos de origen químico, son materiales con cualidades versátiles, al ser resistentes a la degradación y a la vez ligeros, lo que ha generado que sean un insumo
20 esencial para la mayoría de las industrias. Sin embargo, el tiempo de vida útil de una gran parte de ellos es muy corto; muchos son utilizados para fabricar envases y material de embalaje, provocando que sean desechados al medio ambiente causando graves problemas de contaminación ambiental como es la acumulación de plásticos no degradables, que al ser incinerados provocan la emisión de gases de invernadero a la
25 atmósfera (metano, óxido nitroso y bióxido de carbono). Como una alternativa para evitar los problemas causados por los plásticos convencionales, los plásticos biodegradables son una opción viable. En este sentido, los poli-3-hidroxialcanoatos (PHAs) representan la mejor alternativa dadas sus características estructurales y de compatibilidad con el medio ambiente.

30 Los PHAs son polímeros 100% biodegradables, termoplásticos, elastómeros, insolubles en agua, no tóxicos y biocompatibles. Estos poliésteres poseen características similares a las del polietileno y polipropileno, y por lo tanto pueden utilizarse en lugar de los plásticos

convencionales. Así mismo son degradados totalmente en condiciones aerobias y anaerobias por microorganismos del suelo, mar, agua de lago, y aguas residuales^{1,2}.

Los PHAs son clasificados en base al número de átomos de carbono en sus unidades monoméricas, dividiéndolos en dos grupos, PHAs de cadena corta (PHA_{sc}) con 3-5 átomos de carbono y de cadena media (PHA_{mc}) con 6-14 átomos de carbono. La estructura química de los PHAs se puede observar en la fórmula 1:

Fórmula 1



10

En donde n puede ser de 600 a 35,000. En la tabla 1 se puede observar el nombre del PHA generado cuando R es sustituido por el radical que se indica en su unidad monomérica.

15

Tabla 1

R	PHA	Carbonos en la unidad monomérica	Cadena	Siglas
Hidrógeno	Poli-3-hidroxipropionato	3	Corta	PHP
Metilo	Poli-3-hidroxibutirato	4	Corta	PHB
Etilo	Poli-3-hidroxivalerato	5	Corta	PHV
Propilo	Poli-3-hidroxihexanoato	6	Media	PHH
Pentilo	Poli-3-hidroxioctanoato	8	Media	PHO
Nonilo	Poli-3-hidroxidodecanoato	12	Media	PHDD

20

25

Los PHAs son biodegradables y exhiben propiedades térmicas y mecánicas similares a los termoplásticos como polietileno y polipropileno, por lo tanto tienen un gran potencial de aplicaciones médicas e industriales³.

30

La familia de los PHAs tienen una amplia variedad de propiedades mecánicas ya que la incorporación de unidades monoméricas de 6 a 14 carbonos da como resultado un mayor peso molecular y mejora sus características físicas ya que son elastómeros semicristalinos

con un bajo punto de fusión, una baja fuerza de tensión y una elevada extensión a la ruptura, además de tener una mayor biodegradabilidad⁴. Los PHAs de cadena media (PHA_{mc}), tienen un porcentaje de cristalinidad mucho más bajo y son más elásticos, pues aumenta su resistencia al impacto mientras que el modulo de Young disminuye, lo que les da mayor intervalo de aplicaciones en comparación con los PHAs de cadena corta⁵ (ver tabla 2).

Tabla 2
Propiedades de los PHAs y polipropileno

Parámetro	PHB	P(3HB-HV)	P(3HB-4HO)	P(3HO-3HH)	Polipropileno
T _m (°C)	179	145	150	61	176
T _g (°C)	-4	-1	-7	-36	-10
Cristalinidad (%)	70	56	45	30	60
Extensión a la ruptura (%)	5	50	444	300	400
Módulo de Young (GPa)	3.5	2.9	--	--	1.7

T_m Temperatura de fusión.

T_g Temperatura de transición vítrea.

Los PHAs son plásticos no tóxicos, biocompatibles y biodegradables que se pueden producir a partir de recursos renovables. Tienen un alto grado de polimerización, con un grado de cristalinidad en el intervalo de 60 a 80%, son activos ópticamente e isotácticos (es decir con regularidad estereoquímica en unidades repetidas), piezoeléctricos e insolubles en agua. Estas características los hacen altamente competitivos frente al polipropileno y plásticos derivados del petróleo^{3,6}.

Los PHAs inicialmente fueron usados en películas de empaquetado principalmente en bolsas, contenedores y empaques de papel⁶. Estas películas también pueden ser usadas para hacer láminas con otros polímeros como el alcohol polivinílico⁵.

Otras aplicaciones de los PHAs es utilizarlos como utensilios, productos higiénicos femeninos, contenedores de cosméticos y envases de champú. Además de su potencial como material plástico, los PHAs también son usados como componentes estereo regulares que pueden servir como precursores quirales para la síntesis química de

componentes ópticamente activos⁶. También son usados como portadores biodegradables para la dosificación de medicamentos, hormonas, insecticidas y herbicidas, y como materiales osteosintéticos en la estimulación de crecimiento de hueso, por sus propiedades piezoeléctricas, en placas de hueso, estructura quirúrgica y remplazamiento en vasos sanguíneos^{3,6}.

Los PHAs son poliésteres de hidroxialcanoatos sintetizados por al menos 75 géneros diferentes de bacterias tanto Gram negativas como Gram positivas, como por ejemplo *Wautersia eutropha*, *Bacillus megaterium*, *Klebsiella aerogenes*, *Pseudomona putida*, *P. oleovarans*, *Sphaerotilus natans*, entre otras (ver tabla 3). Estos polímeros se acumulan intracelularmente en la bacteria como inclusiones en condiciones de estrés, tales como limitación de fósforo, nitrógeno, oxígeno y pH no óptimo en el medio de cultivo, llegándose a encontrar que los PHAs pueden representar hasta el 80% de peso seco del producto obtenido de la fermentación³.

Tabla 3
Producción de PHAs por bacterias

Microorganismo	Fuente de carbono	PHA producido	Contenido de PHA*
<i>Wautersia eutropha</i>	Fructosa	PHB	46-90
	Glucosa	PHB	46-85
	Propionato	PHB	26-36
	Octanoato	PHA	38-45
<i>Bacillus megaterium</i> QMB1551	Glucosa	PHB	20
<i>Klebsiella aerogenes</i> recombinante	Melazas	PHB	65
<i>Pseudomona putida</i>	Aceite de palma	PHA	37
	Ácido láurico	PHA	25
	Ácido mirístico	PHA	28
	Acido oléico	PHA	19
<i>P. oleovarans</i>	Gluconato	PHB	1.1-0.5
	Octanoato	PHB	50-68
<i>Sphaerotilus natans</i>	Glucosa	PHB	40

* % peso seco.

Los PHAs producidos por bacterias han mostrado un peso molecular suficientemente alto como para tener características similares a las de los plásticos convencionales, tales como el polipropileno.

Se sabe que los PHAs producidos por microorganismos pueden tener una variedad de composiciones y estructuras dependiendo del tipo de microorganismo usado para su producción, así como también la composición del medio de cultivo y las condiciones en que se lleva a cabo su crecimiento.

Por ejemplo, ha sido reportado que *Wautersia eutropha* H16, ATCC no. 17699 y sus cepas mutantes producen copolímeros del ácido 3-hidroxi-butírico (3HB) y ácido 3-hidroxi-valérico (3HV) en diversas proporciones cuando se cambian las fuentes de carbono en el cultivo.

Se ha descrito^{7,8} la producción de copolímeros binarios de 3HB y ácido 3-hidroxi-hexanoico (3HH) mediante el cultivo de *Aeromonas caviae* con ácido oleico o aceite de olivo como fuente de carbono.

Baanaado⁹ describe la producción de PHAs, teniendo como unidades monoméricas 3-hidroxi-alcanoato, unidades de 6 a 12 carbonos empleando como fuente de carbono hidrocarburo(s) alifático(s) y usando *Pseudomonas oleovorans* ATCC 29347.

Se ha descrito¹⁰ que *Pseudomonas resinovorans* produce un poliéster con unidades monoméricas de ácido 3-hidroxi-butírico, ácido 3-hidroxi-hexanoico, ácido 3-hidroxi-octanoico y ácido 3-hidroxi-decanoico en un ratio 1:15:75:9 empleando ácido octanoico como única fuente de carbono. También se produce poliéster teniendo unidades de ácido 3-hidroxi-butírico, ácido 3-hidroxi-hexanoico, ácido 3-hidroxi-octanoico y ácido 3-hidroxi-decanoico en un ratio cuantitativo de 8:62:23:7 empleando ácido hexanoico como fuente única de carbono.

Se ha descrito¹¹ que *Pseudomonas sp.* cepa 613 produce un poliéster consistente de ácidos 3-hidroxi-alcanoicos, tales como ácido 3-hidroxi-butírico, ácido 3-hidroxi-hexanoico, ácido 3-hidroxi-octanoico, ácido 3-hidroxi-decanoico y ácido 3-hidroxi-dodecanoico, así como de ácidos 3-hidroxi-alkenoicos, tales como ácido 3-hidroxi-5-cis-dodecanoico y ácido 3-hidroxi-5-cis-dodecanoico, usando gluconato de sodio como única fuente de carbono.

Wautersia eutropha (antes *Ralstonia eutropha*) es una bacteria Gram negativa, aerobia obligada, quimio-organotrófica capaz de acumular de 8 a 13 gránulos con PHAs en la célula con un diámetro que varía de 0.2 a 0.5 μm . Las inclusiones hidrofóbicas, suspendidas en el citoplasma de la célula, contienen 5-10% en peso de agua y están en

gran parte en estado amorfo. Después de una destrucción celular, cuando el PHA es extraído, ocurre rápidamente una cristalización.

Entre los PHAs sintetizados por *Wautersia eutropha*, el polihidroxibutirato (PHB) es el más ampliamente estudiado, el cual tiene un peso molecular en un intervalo de 10^4 - 10^6 Da y una polidispersidad de 2. Presenta una temperatura de transición vítrea (T_g) de -4°C , mientras que la temperatura de fusión se presenta a 180°C , similar a la del polipropileno; no obstante presenta un porcentaje de extensión a la ruptura de sólo 5%. Su relativamente alto punto de fusión, cercano a su temperatura de descomposición térmica, determina sus límites de procesabilidad.

- 10 El precio del PHA depende del costo del sustrato, el rendimiento y la eficiencia de formulación en el proceso; esto implica altos niveles de PHAs como porcentaje en peso seco y alta productividad, en términos de gramo de producto por unidad de volumen por tiempo⁶.

15 Seleccionar un sustrato adecuado es un factor importante en la optimización de la producción de PHAs. La naturaleza del sustrato no sólo determina el contenido de PHA, sino también la composición, la cual afecta subsecuentemente las propiedades finales del polímero. Dentro del costo final de los materiales usados para producir PHAs, el 80% corresponde a la fuente de carbono utilizada, por lo tanto el precio de los PHAs se puede reducir al utilizar sustratos baratos.

- 20 En este sentido, para producir PHAs de cadena corta de bajo costo como PHB, se utilizan fuentes de carbono simples como glucosa o fructosa, además de ácidos orgánicos volátiles como acético, propiónico y butírico. Por otro lado, con ácido valérico se logra obtener un copolímero (PHB-HV) en diferentes proporciones¹².

25 Pradella¹³ por ejemplo, describe un proceso de producción de PHAs de cadena corta teniendo como fuente de carbono aceite de soya o ácidos grasos provenientes de éste, aceite de palma, algodón, maíz, girasol o "mamona". El proceso consiste de cuatro etapas, para lo cual se emplean las cepas bacterianas *Wautersia eutropha* IPT026 o IPT027 y las cepas de *Burkholderia cepacia* IPT048, 064, 066, 074, 110 ó 189. La etapa de crecimiento de la biomasa (etapa II) se lleva a cabo mediante un sistema de retroalimentación (feed bath).

30 bath). El rendimiento obtenido de PHAs mediante este método es de 90% de biomasa seca con una concentración de biomasa bacteriana de 200 g/L de medio de fermentación y una conversión de masa de carbono a masa de PHA de 0.6 Kg/Kg.

Bright¹⁴ por ejemplo describe la producción de PHAs mediante células de plantas productoras de aceites vegetales, canola, soya y girasol que contienen uno o varios genes de enzimas que intervienen en la ruta de síntesis de PHAs provenientes del microorganismo *Wautersia eutropha*, el cual sintetiza en forma natural PHA. Es importante

5 hacer notar que para llevar a cabo este tipo de proceso es necesario el uso de técnicas de ADN recombinante.

Son diversos y múltiples los trabajos donde se describen procesos de obtención de PHAs de características muy específicas, mediante técnicas de ADN recombinante. En este sentido, Nagaoka¹⁵ describe la creación de una nueva cepa de *Wautersia eutropha* para
10 producir poliésteres que contengan especialmente unidades monoméricas P(3HB-co-3HH) mediante la inserción del gen de la enzima ácido polihidroxialcano sintetasa, la cual participa en la síntesis de PHAs, obteniéndose con ello un PHA con características especiales en cuanto a su flexibilidad y dureza.

A pesar de que el empleo de técnicas de biología molecular y de ADN recombinante son
15 de gran utilidad para dirigir la producción de PHAs hacia un producto muy específico, este tipo de metodologías incrementa el precio de producción de los PHAs, siendo que con la manipulación de los métodos de fermentación y las fuentes de alimentación de los microorganismos que producen PHAs se pueden obtener dichos polímeros a menos costos con las características deseadas.

20 A diferencia de la síntesis de PHAs de cadena corta, la síntesis de PHAs de cadena media requiere utilizar sustratos donde se encuentren ácidos orgánicos como ácido octanóico, dodecanóico, láurico y mirístico con los que se pueden incorporar unidades monoméricas de 8 hasta 14 carbonos debido al diferente contenido de carbonos de cada ácido¹⁶. Sin embargo el costo de purificación de estos ácidos para usarlos como sustrato puede ser
25 elevado, lo que repercute en los costos de producción de los PHAs al utilizarlos como sustrato en procesos de fermentación.

Por otro lado, las fermentaciones con ácidos orgánicos de cadena corta (butírico y valérico) han sido muy estudiadas ya que estos dos ácidos pueden causar toxicidad o ser inhibitorios para el crecimiento celular dependiendo del pH y de su concentración en el
30 medio de cultivo.

A pesar de que el uso de la bacteria *Wautersia eutropha* en la obtención de PHAs ha demostrado ser de gran utilidad, ésta solo ha podido ser crecida utilizando fuentes de

carbono como glucosa, propionato, valerato, metanol, sucrosa y propanol, con lo cual solo es posible obtener actualmente copolímeros de hidroxialcanoatos de cadena corta como PHB-HV¹⁷.

Por lo anterior, es necesario contar con metodologías de producción de PHAs de cadena media de bajo costo, con la finalidad de obtener plásticos biodegradables con mejores propiedades físicas y una mayor biodegradabilidad.

Objetivos de la invención.

Por lo anterior, es uno de los objetivos de la presente invención proporcionar métodos para la producción de PHAs de cadena media mediante el crecimiento de microorganismos utilizando aceites vegetales como fuente de carbono.

Es otro de los objetivos de la invención, proporcionar métodos para la producción de PHAs de cadena media mediante el crecimiento de microorganismos utilizando aceites vegetales y fructosa como fuentes de carbono.

Es otro de los objetivos de la invención, proporcionar métodos para la producción de PHAs de cadena media mediante el crecimiento de microorganismos utilizando aceite de canola como fuente de carbono.

Es otro de los objetivos de la invención, proporcionar métodos para la producción de PHAs de cadena media mediante el crecimiento de microorganismos utilizando aceite de canola y fructosa como fuentes de carbono.

Es otro de los objetivos de la invención, proporcionar métodos para la producción de PHAs de cadena media mediante el crecimiento de *Wautersia eutropha* utilizando aceite de canola y fructosa como fuentes de carbono.

Es otro de los objetivos de la invención, proporcionar PHAs de cadena media obtenidas a partir del crecimiento de microorganismos utilizando aceite de canola y fructosa como fuentes de carbono.

Es aún otro de los objetivos de la invención, proporcionar PHAs de cadena media que comprendan monómeros de PHO y PHDD como unidades repetidas en su estructura.

Breve descripción de las figuras.

Figura 1. Se muestra una gráfica de los perfiles de concentración de biomasa total (X), biomasa residual (Xr) y PHAs a nivel matraz usando aceite de canola como

fuelle de carbono. Se observa crecimiento celular con fructosa (A) y adici3n de aceite vegetal (B).

- 5 **Figura 2.** Se muestra una gr1fica de los perfiles de concentraci3n de biomasa total (X), biomasa residual (Xr) y PHAs a nivel bioreactor usando aceite de canola como 1nica fuente de carbono. Se observa cultivo en lote (A), cultivo en lote alimentado (B) y producci3n de PHAs (C).
- 10 **Figura 3.** Se muestra una gr1fica del perfil de concentraci3n de fructosa durante la fermentaci3n usando aceite de canola como 1nica fuente de carbono. Se observa cultivo en lote (A), cultivo en lote alimentado (B) y producci3n de PHAs (C).
- 15 **Figura 4.** Se muestra una gr1fica del perfil de concentraci3n de amonio durante la fermentaci3n usando aceite de canola como 1nica fuente de carbono. Se observa cultivo en lote (A), cultivo en lote alimentado (B) y producci3n de PHAs (C).
- 20 **Figura 5.** Se muestra una gr1fica del perfil de concentraci3n de aceite de canola en la fase 3 de la fermentaci3n con aceite de canola.
- Figura 6.** Se muestra una gr1fica del perfil de concentraciones de biomasa total (X), biomasa residual (Xr) y PHAs usando aceite de canola y fructosa como fuentes de carbono. Se observa cultivo en lote (A), cultivo en lote alimentado (B) y producci3n de PHAs (C).
- 25 **Figura 7.** Se muestra una gr1fica del perfil de concentraci3n de fructosa durante la fermentaci3n usando aceite y fructosa como fuentes de carbono. Se observa cultivo en lote (A), cultivo en lote alimentado (B) y producci3n de PHAs (C).
- Figura 8.** Se muestra una gr1fica del perfil de concentraci3n de aceite en la fase 3 de la fermentaci3n con aceite de canola y fructosa.
- 30 **Figura 9.** Se muestra una gr1fica del perfil de concentraci3n de amonio durante la fermentaci3n usando aceite y fructosa como fuentes de carbono. Se observa cultivo en lote (A), cultivo en lote alimentado (B) y producci3n de PHAs (C).
- Figura 10.** Se muestran los espectros de RMN ^{13}C (A) y de RMN de ^1H (B) de polihidroxi butirato (PHB).
- Figura 11.** Se muestran los espectros de RMN ^{13}C a 500 Mhz de los PHAs obtenidos mediante el m3todo de la invenci3n, utilizando aceite de canola como 1nica

fuelle de carbono (A) o a partir de aceite de canola y fructosa como fuentes de carbono (B). Se distingue hidroxibutirato (HB), hidroxivalerato (HV), hidroxioctanoato (HO) e hidroxidodecanoato (HDD).

5 **Figura 12.** Se muestran los espectros de RMN ^1H a 125 Mhz de los PHAs obtenidos mediante el método de la invención, utilizando aceite de canola como única fuente de carbono (A) o a partir de aceite de canola y fructosa como fuentes de carbono (B).

10 **Figura 13.** Se muestran los espectros de FT-IR en la región 4000 a 650 cm^{-1} de los PHAs obtenidos mediante el método de la invención, utilizando aceite de canola y fructosa como fuentes de carbono (a), utilizando aceite de canola como única fuente de carbono (b) y PHB (c).

15 **Figura 14.** Se muestran los espectros de FT-IR en la región 3600 a 2600 cm^{-1} de los PHAs obtenidos mediante el método de la invención, utilizando aceite de canola y fructosa como fuentes de carbono (a), utilizando aceite de canola como única fuente de carbono (b) y PHB (c).

Figura 15. Se muestran los espectros de FT-IR en la región 1850 a 1600 cm^{-1} de los PHAs obtenidos mediante el método de la invención, utilizando aceite de canola y fructosa como fuentes de carbono (a), utilizando aceite de canola como única fuente de carbono (b) y PHB (c).

20 **Figura 16.** Se muestran los termogramas de los PHAs obtenidos mediante el método de la invención, utilizando aceite de canola y fructosa como fuentes de carbono (A), utilizando aceite de canola como única fuente de carbono (B) y PHB (C).

Descripción detallada de la invención.

25 La presente invención proporciona métodos eficientes de fermentación de bajo costo para la producción eficiente de PHAs de cadena media que comprenden el crecimiento de microorganismos utilizando aceites vegetales como sustrato, o bien en presencia de aceites vegetales y fructosa.

30 Para efectos de la invención, métodos de fermentación eficientes con un bajo costo de producción se pueden lograr utilizando aceites vegetales como sustrato, ya que presentan una gran variedad de ácidos grasos en su composición. Un ejemplo es el aceite de canola,

el cual está constituido básicamente por siete ácidos grasos en diferentes proporciones como se muestra en la tabla 4.

Tabla 4
Composición del aceite de canola

Acido graso	% p/p
Ácido palmítico	5.2
Ácido esteárico	2.2
Ácido araquinoico	0.56
Ácido palmitoleico	0.2
Ácido oleico	60.03
Ácido linoleico	21.22
Ácido linolénico	7.81

- 5
- 10
- 15 Aunque para efectos de la invención, pueden ocuparse aceites vegetales que se produzcan normalmente en grandes cantidades debido a su bajo costo de producción, por ejemplo aquellos destinados a consumo humano o animal, tales como aceite de girasol, soya, maíz, olivo, cártamo, canola y mezclas de los mismos, se prefiere utilizar aceite de canola debido a los rendimientos de PHAs que se obtienen con éste.
- 20 La presente invención proporciona copolímeros de PHAs con unidades monoméricas de cadena media producidos por microorganismos a muy bajo costo, y que pueden ser útiles en la industria debido a las características físicas que exhiben. Los PHAs de la presente invención contienen unidades monoméricas con más de cinco carbonos que los obtenidos previamente mediante microorganismos utilizando aceites vegetales como fuentes de
- 25 carbono o bien con otras fuentes de carbono.
- Debido a que los PHAs de la presente invención exhiben temperaturas de fusión de 130 a 150°C, los hace más convenientes que los PHAs conocidos hasta el momento para procesos industriales donde la temperatura de fusión es un factor importante, como por ejemplo en procesos de moldeado a temperaturas medias.
- 30 La presente invención proporciona métodos para producir PHAs de cadena media, que comprenden cultivar un microorganismo capaz de producir PHAs bajo condiciones tales que estos puedan acumularse, por ejemplo mediante limitación de algún nutriente en el

medio de cultivo, por ejemplo, nitrógeno, oxígeno o una fuente de fósforo, requeridos para el crecimiento del microorganismo pero no para la acumulación de los PHAs. Durante la fase de acumulación de PHAs, se suministra aceite vegetal en presencia o ausencia de sacaridos, con lo cual los PHAs se acumulan dentro del microorganismo y posteriormente son recuperados. El proceso de la invención también comprende una fase previa a la producción de PHAs que permite incrementar la cantidad de biomasa producida, con lo cual es posible incrementar los rendimientos de obtención de PHAs de cadena media, los cuales alcanzan al menos 90% de PHAs del peso seco de la biomasa obtenida de la fermentación.

10 Para la obtención de los PHAs descritos aquí, es posible utilizar microorganismos nativos o transformados genéticamente para producirlos, lo que permite eliminar la necesidad de utilizar cepas transformadas genéticamente para este propósito y reducir los costos de producción.

Conforme al método de la presente invención, cuando el microorganismo es cultivado en un proceso de fermentación de tres fases (cultivo por lote, cultivo en lote alimentado y producción de PHAs) en presencia de aceite vegetal en la fase de producción de PHAs, el microorganismo produce y acumula un polímero que comprende las unidades monoméricas PHB, PHV, PHO y PHDD. En este mismo sentido, cuando en la fase de producción de PHAs existe aceite vegetal como única fuente de carbono, se produce el polímero mencionado pero conteniendo un 5% de unidades monoméricas de cadena media, es decir PHO y PHDD; mientras que cuando existe aceite vegetal y un sacárido como fuentes de carbono en la fase de producción de PHAs, se produce el polímero mencionado pero conteniendo un 10% de unidades monoméricas de cadena media, es decir PHO y PHDD.

25 Como se puede observar, cambiando la fuente de carbono para producir PHAs en los métodos de la invención, es posible adicionar un mayor porcentaje de unidades monoméricas de cadena media a los PHAs obtenidos, con lo cual se producen polímeros con diferentes propiedades, por ejemplo, con diferentes puntos de fusión. Así mismo, el uso de aceite vegetal como fuente de carbono para producir PHAs en los métodos de la invención, permite obtener dichos biopolímeros a un costo considerablemente más bajo.

30 Los microorganismos que pueden utilizarse en el método de la invención pueden ser aquellos capaces de producir PHAs de cadena corta, los cuales se seleccionan del grupo

que comprende los géneros *Wautersia*, *Klebsiella*, *Zoogloea*, *Bacillus*, *Aeromona*, *Azotobacter*, *Clostridium*, *Nocardia*, *Halobacterium*, *Burkholderia*, *Sphaerotilus* y *Pseudomonas*, aunque se prefiere utilizar *Wautersia*.

Los nutrientes esenciales requeridos para el crecimiento del microorganismo comprenden
5 elementos que están normalmente presentes en el medio de cultivo en forma fácilmente asimilable, tales como nitrógeno, fósforo, azufre, potasio, sodio, magnesio, calcio y fierro, junto con trazas de manganeso, zinc y cobre. Mientras que puede ser posible inducir la acumulación de los PHAs de cadena media restringiendo la fuente de oxígeno al microorganismo, se prefiere restringir la fuente de uno o más de los nutrientes esenciales,
10 como por ejemplo nitrógeno ó fósforo.

Como fuentes de nutrientes a ser administradas al medio de cultivo, pueden utilizarse
sacáridos como fuente de carbono, los cuales se seleccionan del grupo que comprende
arabinosa, glucosa, manosa, fructosa, galactosa, sorbitol, manitol e inositol, aunque es
más preferible utilizar fructosa, mientras que pueden utilizarse como fuentes de nitrógeno
15 compuestos seleccionados del grupo que comprende amoníaco, sales de amonio como
por ejemplo sulfato de amonio, nitratos y/o nitrógeno orgánico contenidos en compuestos
tales como urea, caseína, peptona, extracto de levadura y extracto de carne.

La fuente de carbono se puede utilizar en una cantidad que pueda generar los PHAs de
cadena media de la invención y que no inhiba el crecimiento del microorganismo,
20 utilizándose generalmente una concentración de 2 a 18 g/L, preferiblemente de 8 a 12 g/L
en el medio de cultivo. En el caso de la fuente de nitrógeno, ésta puede utilizarse en una
concentración de 1 a 20 g/L, preferiblemente de 1 a 2 g/L en el medio de cultivo.

Para efectos de la presente invención, la temperatura de cultivo puede oscilar entre 27 a
32 °C, preferentemente 31°C, mientras que el pH puede oscilar entre 6.5 a 8,
25 preferentemente entre 6.7 a 7.5.

La recuperación de los PHAs de la presente invención puede lograrse por cualquier
método conveniente conocido hasta el momento. De forma general las células que
contienen PHAs pueden ser separadas del líquido de fermentación por centrifugación,
rotas posteriormente y extraídos los PHAs con un solvente orgánico, preferentemente
30 cloroformo. Sin embargo, en ambientes donde un solvente orgánico es inadecuado para
usarse, métodos para eliminar los componentes de la célula mediante tratamiento con

tensoactivos como SDS, enzimas como lisozima, y agentes químicos como EDTA, hipoclorito de sodio, amoníaco y similares pueden ser utilizados.

Cualesquiera medios de cultivo y métodos de cultivo conocidos hasta el momento pueden utilizarse para proveer los nutrientes necesarios a los microorganismos para permitir su
5 crecimiento y producción de los PHAs de la invención. En una modalidad de la invención, se proporcionan métodos para cultivar tales microorganismos en medios que no se limitan a nutrientes esenciales, es decir nutrientes que están presentes en una concentración tal que permitan la multiplicación del microorganismo productor de PHAs.

Con la finalidad de producir PHAs con mejores propiedades térmicas y mecánicas, el
10 método de la presente invención plantea su producción mediante dos estrategias que comprenden fermentaciones en tres fases.

I. Producción de PHAs de cadena media con aceite vegetal como única fuente de carbono.

15

Primera fase. Cultivo en lote.

Se obtiene un crecimiento celular y adaptación al cultivo del microorganismo productor de PHAs, lo cual se realiza mediante una fermentación por lote. En esta fase se hace crecer al microorganismo en presencia de un sacárido como única fuente de carbono a una
20 concentración de 10 g/L, así como en presencia de una fuente de nitrógeno, en una concentración de 0.45 g/L. En esta fase la fermentación continúa hasta lograr que el sacárido presente en el medio se consuma en al menos el 80% de su concentración inicial.

Segunda fase. Cultivo en lote alimentado.

Se produce una mayor densidad celular del microorganismo adicionando sustratos de manera controlada al medio de fermentación (lote alimentado), con lo cual se logra una mayor producción de biomasa total durante la fermentación. En esta fase, después de consumirse el sacárido conforme a la primera fase, se adiciona el mismo sacárido como
30 fuente de carbono al medio de fermentación de tal manera que su concentración mínima sea de al menos 2 g/L de forma constante y hasta obtener un incremento en la biomasa total de al menos 130% con respecto de la biomasa total obtenida en la primera fase. Así

mismo, se adiciona al inicio de ésta fase una concentración máxima de 0.25 g/L de la fuente de nitrógeno, esto con la finalidad de reponer el nitrógeno consumido durante la primera fase.

5 Durante esta fase, la biomasa crece exponencialmente (ver figura 2), deteniéndose su crecimiento cuando la fuente de nitrógeno deja de administrarse; así mismo el sacárido se consume, por lo que el microorganismo en esta fase no utiliza el sacárido para la producción de PHAs.

Tercera fase. Producción de PHAs.

10 Se producen los PHAs de cadena media adicionando aceite vegetal como única fuente de carbono al medio de fermentación. Durante esta fase, la concentración de la fuente de nitrógeno se mantiene baja (al menos 0.1 g/L), por lo que el microorganismo se encuentra con limitaciones de nitrógeno, garantizando con ello la producción de PHAs con la única
15 fuente de carbono que existe en el medio (aceite vegetal). Después de que el aceite vegetal se adiciona al medio a una concentración de 50 a 60 g/L, se logra una acumulación aproximada del 90% en peso seco de PHAs de cadena media, por lo que el aceite vegetal resulta ser una excelente fuente de carbono para la producción de PHAs de cadena media.

20 Terminada la fermentación, los PHAs son obtenidos de las células microbianas mediante los métodos de extracción mencionados anteriormente.

Los PHAs que se obtienen con éste método, incorporan en su estructura un 5% de monómeros de cadena media.

25 Las fermentaciones en lote alimentado son comúnmente utilizadas para alcanzar una elevada densidad celular, también para evitar la inhibición por sustrato o la inducción de algún tipo de limitación para tener una alta productividad del producto final en el cultivo. El utilizar un sistema de producción de lote alimentado contribuye a aumentar la densidad celular y disminuir los problemas de inhibición que pueden causar los diferentes sustratos. Como se ha mencionado antes, la composición, estructura y longitud de los PHAs de
30 cadena media está relacionada con la fuente de carbono utilizada. Por ello, en la presente invención es conveniente utilizar preferentemente fructosa en la fase de producción de biomasa en lote alimentado (fase dos) y aceite de canola preferentemente como fuente de carbono en la fase de producción de PHAs.

II. Producción de PHAs de cadena media con aceite vegetal y sacárido como fuentes de carbono.

Primera fase. Cultivo en lote.

- 5 Al igual que para el método anteriormente mencionado, en esta fase se permite el crecimiento y adaptación del microorganismo productor de PHAs en presencia de sacárido como fuente de carbono y una fuente de nitrógeno durante el tiempo necesario para que el microorganismo consuma dichas fuentes en el menos el 80% de su concentración inicial.

10 Segunda fase. Cultivo en lote alimentado.

- A diferencia de la segunda fase del método anterior, se administra paulatinamente sacárido al medio de fermentación hasta alcanzar una concentración final de 30 a 40 g/L y la fuente de nitrógeno hasta alcanzar una concentración final de 0.2 g/L (lote-alimentado), con lo cual la biomasa total generada en esta fase se incrementa en al menos 400% con respecto de la biomasa obtenida en la primera fase. Como puede observarse, durante esta fase las fuentes de carbono y nitrógeno adicionadas son utilizadas únicamente para la generación de biomasa total.

Tercera fase. Producción de PHAs.

- 20 A diferencia de la tercera fase del método anterior, al comienzo de ésta fase la concentración mínima de sacárido es de 30 a 40 g/L, con lo cual existe previamente una fuente de carbono en el medio de cultivo. Para la producción de PHAs, se adiciona al medio aceite vegetal como fuente adicional de carbono a una concentración de 40 a 50 g/L y la fuente de nitrógeno a una concentración mínima de 0.4 g/L, siendo esta última mantenida por encima de la concentración indicada durante esta fase. Como puede observarse, en esta fase los PHAs se producen en presencia de dos fuentes de carbono (sacárido y aceite vegetal) y de una concentración incrementada de fuente de nitrógeno, por lo que en esta fase no existe limitación de oxígeno y nitrógeno en el medio. Al final de esta fase, los PHAs obtenidos representan el 90% del peso seco obtenido de la fermentación, siendo estos de cadena media.

30 Terminada la fermentación, los PHAs son obtenidos de las células microbianas mediante los métodos de extracción mencionados anteriormente.

En este caso, es conveniente utilizar preferentemente fructosa en la fase de producción de biomasa en lote alimentado (fase dos) y aceite de canola preferentemente como fuente de carbono en la fase de producción de PHAs.

Los PHAs que se obtienen con éste método, incorporan en su estructura un 10% de monómeros de cadena media.

Durante todas las fases de los métodos anteriores, las fuentes de carbono y nitrógeno se suministran mediante flujos continuos de aproximadamente 0.7 a 0.9 L/h. Así mismo la relación molar carbono/nitrógeno (C/N) en el medio de fermentación se mantiene a una C/N = 14 durante la primera fase, mientras que en la tercera fase se mantiene a una C/N = 120.

De acuerdo a los métodos de la presente invención, es posible incrementar los rendimientos de PHAs de cadena media (peso seco) usando una estrategia de fermentación en tres fases (lote, lote-alimentado y producción de PHAs).

Con los métodos de la presente invención realizados a nivel bioreactor utilizando aceite vegetal como fuente de carbono en presencia y ausencia de fructosa, se alcanza hasta un 90% en peso seco de PHAs, lo que permite altos rendimientos de PHAs de cadena media a bajos costos de producción y en tiempos razonables.

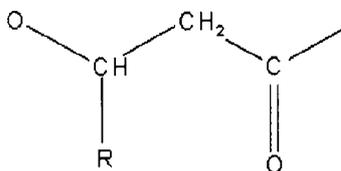
Mediante el método de la invención es posible producir PHAs de cadena media que incorporan en su estructura de 5 a 10% de monómeros de cadena media, preferiblemente con 6 a 12 carbonos en su unidad monomérica. Así mismo mediante el método de la invención, pueden obtenerse PHAs formados por diversos monómeros, preferentemente por monómeros con 4 a 12 carbonos en su unidad monomérica, y más preferentemente por monómeros seleccionados del grupo que comprende PHB, PHV, PHO y PHDD. Los monómeros mencionados, se encuentran formando los PHAs de la presente invención en diversas proporciones, particularmente los monómeros de cadena media (PHO y PHDD) se encuentran en un 5 a 10%, mientras los monómeros de cadena corta (PHB y PHV) conforman el porcentaje restante.

Los PHAs de la invención son polímeros formados por diversas unidades monoméricas y que tienen la estructura de la fórmula 1, donde R es igual a un grupo alquilo de 1 a 9 carbonos, donde preferentemente están conformados por unidades monoméricas donde R es igual a metilo, etilo, pentilo y nonilo.

Así mismo, los PHAs de la invención contienen unidades monoméricas repetidas de fórmula 2 que comprenden de 5 a 10% de unidades monoméricas donde R es un grupo alquilo de 3 a 9 carbonos y de 90 a 95% de unidades monoméricas donde R es un grupo alquilo de 1 a 2 carbonos.

5

Fórmula 2



10 Esto significa que en la estructura de los PHAs de la presente invención, existen de 5 a 10% de unidades monoméricas de cadena media, donde preferentemente están conformadas por unidades monoméricas donde R es igual a pentilo y nonilo, es decir, por 3-hidroxiocetanoato y 3-hidroxi-dodecanoato; mientras que el porcentaje restante está conformado por unidades monoméricas de cadena corta, donde preferentemente están conformadas por unidades monoméricas donde R es igual a metilo y etilo, es decir, por 3-hidroxi-butanato y 3-hidroxi-valerato.

15 Como puede observarse, los métodos de la invención permiten obtener PHAs de cadena media de mayor calidad y mejores características físico-químicas, permitiendo insertar en la estructura polimérica de los PHAs obtenidos, porcentajes del 5 al 10% de unidades monoméricas de 6 a 12 carbonos.

Como una manera de ilustrar la presente invención se muestran los siguientes ejemplos sin el propósito de limitar su alcance.

25 **Ejemplo 1. Producción de PHAs utilizando aceites vegetales como sustratos.**

Un sistema por lote a nivel matraz fue utilizado para el sondeo en la producción de PHAs, usando fructosa como fuente de carbono para el crecimiento bacteriano y posterior adición de diversos aceites vegetales al medio de cultivo.

30 Se preparó un inóculo de *Wautersia eutropha* ATCC 17699 en un matraz Erlenmeyer de 200 mL con 100 mL de medio Luria-Bertani (LB) líquido, manteniéndose en agitación a 200 rpm y 30°C. Dicho inóculo fue posteriormente adicionado a matraces de 250 mL con un volumen de medio de producción de 50 mL. El medio de producción contenía por litro:

- 10 g de fructosa, 1.57 g de NH_4SO_4 , 5.66 g de $\text{NH}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 1.5 g de KH_2PO_4 , 0.2 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 mg de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 20 mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 mL de solución de microelementos (0.3 g de H_3BO_3 , 0.2 g de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.1 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 30 mg de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 30 mg de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 20 mg de $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y 10 mg de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, en una solución de HCl 0.1 N); medio LB fue utilizado para inocular el medio de producción a un 10% v/v. Los matraces fueron colocados en agitación a 200 rpm y a una temperatura de 30°C. Durante el proceso de fermentación (30 h), se tomó una muestra del cultivo cada 2 h, adicionándose a cada matraz 0.250 mL de aceite a las 15 h del proceso de fermentación.
- 10 La concentración de la biomasa residual (X_r) y de PHAs antes de la adición del aceite de prueba fue de 4.9 y 1.4 g/L respectivamente, mientras que la concentración resultante al final del proceso de fermentación se muestra en la tabla 5.

Tabla 5

- 15 **Comparación de biomasa residual y PHAs obtenidos utilizando diferentes aceites vegetales**

Aceite	X_r (g/L)	PHA (g/L)	PHA/ X_r
Canola	3	11.1	3.7
Soya	4.1	6.1	1.4
Olivo	3.4	6.1	1.79
Maíz	3.8	5.4	1.42
Cártamo	3.66	4	1.09
Girasol	3.5	3.2	0.91

- 20
- 25 Como puede observarse de la tabla 5, la concentración de PHAs fue aproximadamente 2 veces mayor cuando la fuente oleosa fue aceite de canola (11 g/L) en comparación con la producción obtenida de PHAs con aceite de soya, olivo o maíz (5-6 g/L), mientras que fue 3 veces mayor en comparación con la concentración de PHAs producidos con aceite de cártamo o girasol (3-4 g/L). Además se observó que la biomasa residual medible (X_r ,
- 30 fracción de biomasa que está metabólicamente activa) varió de 3 a 4 g/L, dependiendo de la fuente de carbono utilizada.

Como se observa en la figura 1, cuando se adiciona aceite para la producción de PHAs, éste es efectivamente consumido para la producción de dichos biopolímeros.

Ejemplo 2. Producción de PHAs a nivel bioreactor utilizando aceite de canola como sustrato.

Derivado de los resultados obtenidos en el ejemplo 1, se seleccionó el aceite de canola para obtener PHAs a nivel bioreactor empleando dos estrategias de producción diferentes. Por una parte, utilizando aceite de canola como única fuente de carbono y por la otra aceite de canola y fructosa como fuentes de carbono.

En cualquiera de las dos estrategias, la producción de PHAs se realizó en un bioreactor de 6 L BIOFLO 3000 (New Brunswick Scientific), creciendo la bacteria previamente en medio LB para inocular el reactor al 10% v/v. El medio utilizado para la producción fue el mismo que se utilizó en el ejemplo 1.

Para todas las fermentaciones la temperatura se controló a 30°C y el pH a 7 usando soluciones de H₃PO₄ 0.47 M y de NaOH 2 M con un flujo de aire de 5 L/min. La toma de muestra fue realizada cada 2 h.

Las fermentaciones se realizaron en tres fases:

Fase 1: Producción de biomasa en cultivo por lote, a una C/N = 14, con un volumen de 3L.

Fase 2: Producción de biomasa en lote alimentado con solución de fructosa concentrada,

y

Fase 3: Producción de PHAs alimentando aceite vegetal (previamente seleccionado a nivel matraz), como fuente de carbono, en limitación de nitrógeno, a una C/N de 120.

Producción de PHAs con aceite de canola como única fuente de carbono.

Wautersia eutropha fue cultivada en fermentador utilizando un sistema de producción en tres fases. La primera fase fue una fermentación en lote para crecer y adaptar a la bacteria, la segunda fase fue un lote alimentado en el que se logra una mayor producción de biomasa total y en la tercera fase se adicionó el aceite vegetal al medio para producir PHAs.

Para la producción bajo estas condiciones, se utilizó una solución de fructosa y sulfato de amonio que se alimentaron al fermentador a concentraciones de 30 g/L y 9.37 g/L respectivamente, con un flujo de 0.9 L/h a una velocidad de agitación de 300 rpm. No hubo

control sobre el oxígeno disuelto en el medio. Una vez que la fructosa en el medio fue consumida, se adicionó el aceite para la producción de PHAs.

En la figura 2 se puede observar la cinética de producción de biomasa total (X), biomasa residual (X_r) y polihidroxialcanoatos (PHAs). La fase de producción por lote se inicia con un volumen de 3 L y una concentración de 10 g/L de fructosa, observándose una fase lag de 5 h. La concentración de biomasa total alcanzada en esta primera fase fue de 3 g/L a las 18 h de fermentación, consumiendo 8 de los 10 g/L disponibles de fructosa al inicio del proceso, de manera que se obtiene un rendimiento $Y_{x/s} = 0.42 \text{ g}_x/\text{g}_s$ y una velocidad de consumo promedio de 0.4 g/h.

En la segunda etapa fue alimentada fructosa a una concentración de 30 g/L y un flujo de 0.9 L/h por 2 h a partir de las 18.5 h de fermentación. Durante esta fase se alcanzaron concentraciones de biomasa total y biomasa residual de 7 y 5.15 g/L respectivamente con una velocidad de consumo de 3.01 g/h, lo que indicó que el sustrato alimentado fue utilizado para producción de biomasa residual donde el rendimiento alcanzado durante la alimentación fue de $0.35 \text{ g}_x/\text{g}_s$. Al final de la alimentación, se comprobó que la fructosa alimentada en el medio había sido consumida (ver figura 3), antes de adicionar el aceite de canola, con el fin de comenzar la tercer fase.

La fructosa fue consumida a partir de las 5 h de fermentación hasta llegar a una concentración de 2 g/L, concentración que se mantuvo durante el lote alimentado. Al terminar la alimentación de fructosa el reactor se operó en lote, por lo que la fructosa residual fue consumida (ver figura 3), con lo cual se garantizó que *W. eutropha* no utilizó fructosa para producir los PHAs en la tercera fase.

La concentración de amonio fue determinada durante las tres fases de la fermentación. En la figura 4 se puede observar que el amonio es consumido rápidamente, siendo la concentración inicial de amonio de 0.423 g/L y al final de la primera fase de 0.03 g/L, teniendo una velocidad de consumo promedio de 0.12 g/h. Al iniciar la fase de producción se alimentó sulfato de amonio al mismo tiempo que la fuente de carbono (9.54 g/L de sulfato de amonio) a un flujo de 0.9 L/h, para llegar a una concentración de 0.25 g/L. En la figura 2 se puede observar que durante la segunda fase la biomasa creció exponencialmente, y al detenerse la alimentación el crecimiento cesó.

Durante la fase de producción la concentración de amonio se mantuvo entre 0.15 y 0.1 g/L. Yan¹⁸ reporta que *W. eutropha* se mantiene suficientemente activa para producir

PHAs a una concentración de 100 mg/L de amonio. Lo que indica que la bacteria se encontró con limitaciones de nitrógeno para seguir con un metabolismo de crecimiento, pero tenía las condiciones óptimas para producir PHAs con la única fuente de carbono presente.

- 5 La estimación del consumo de aceites se muestra en la figura 5. Como puede observarse se consumió el 15% de los 74 g/L de aceite adicionado, para un rendimiento $Y_{g_{\text{PHA}}/g_{\text{Sustrato}}} = 0.68 \text{ g}_{\text{PHA}}/\text{g}_{\text{Sustrato}}$, una velocidad de consumo de 0.72 g/Lh y una productividad de 0.45 g/Lh.

Los resultados indican que el aceite vegetal utilizando es una excelente fuente de
10 carbono para la biosíntesis de PHAs, ya que se logra una acumulación aproximada de 90% en peso seco de PHAs, mayor que lo reportado hasta el momento y 10% más del porcentaje reportado por Fukui¹⁹ al utilizar aceite de oliva.

Los reportes en la literatura no son comparables con la presente invención ya que no se han realizado fermentaciones utilizando un sistema en tres fases como el propuesto aquí.

15

Producción de PHAs con aceite de canola y fructosa como fuentes de carbono.

En este caso, se utilizó una solución de fructosa y sulfato de amonio que se alimentaron al fermentador a concentraciones de 120 g/L y 34.6 g/L respectivamente, con un flujo de 0.225 Lh^{-1} y una velocidad de agitación que varió de 300 – 800 rpm fijando un nivel
20 mínimo de OD en 40 %. Se adicionó el aceite cuando aún existía fructosa en el medio.

La producción de PHAs con aceite de canola y fructosa, como en el caso de la producción con aceite de canola, dio un porcentaje de PHAs en peso seco del 90 %.

Como puede observarse en la figura 6, las cinéticas muestran que la fase de adaptación fue de 5 h y la concentración de biomasa alcanzada en la primera fase fue de 3 g/L, igual
25 a la fermentación con solo aceite de canola. Sin embargo esta concentración máxima fue alcanzada en un tiempo menor (14 h). El rendimiento obtenido en esta primera fase fue de $0.4 \text{ g}_x/\text{g}_s$ con una velocidad de consumo de 0.09 g/Lh.

La segunda fase se inició cuando la concentración de fructosa en el medio era de 2.4 g/L. Se alimentó un flujo de 0.225 L/h a una concentración de 117 g/L de fructosa. Al final de
30 esta fase se alcanzaron concentraciones de biomasa total y biomasa residual de 11.55 y 4.4 g/L respectivamente, con una velocidad de consumo de 0.31 g/Lh. Esto indicó que el

sustrato suministrado fue utilizado para producción de biomasa residual ya que el rendimiento alcanzado durante la alimentación fue de 0.9 g_{xr}/g_s.

El perfil de concentración de fructosa resultante en esta fermentación se puede observar en la figura 7.

- 5 Con el objetivo de conocer el efecto de producir PHAs en presencia de dos fuentes de carbono a la vez, se adicionó 74 g/L de aceite de canola cuando la concentración de fructosa en el medio era aún elevada, de forma que la relación C/N se aumentó a 180 provocando un exceso en la fuente de carbono y una concentración baja de nitrógeno.

Como puede observarse en la figura 7, después de la adición del aceite hubo consumo
10 simultáneo de fructosa y aceite, indicando que ambas fuentes de carbono se utilizaron para producir PHAs. El rendimiento de carbono en esta etapa de la fermentación fue $Y_{gC_p/gC_s} = 0.3_{gC/gC}$.

La estimación del porcentaje de aceite consumido en esta fermentación fue del 40% (ver figura 8), siendo mayor que en la fermentación en la que se utilizó únicamente aceite de
15 canola como fuente de carbono.

Este alto consumo de aceite podría explicarse por el oxígeno disuelto disponible en el medio ya que fue controlado con la velocidad de agitación para mantener un mínimo de 40%. Por lo tanto, en esta fermentación el O₂ no fue limitante para la producción de PHAs. La concentración de amonio fue determinada durante las tres fases de la fermentación. En
20 la figura 9 se puede observar que el amonio es consumido rápidamente durante la primera fase, siendo la concentración inicial de amonio de 0.43 g/L y al final de esta fase de 0.074 g/L, teniendo una velocidad promedio de consumo mayor a la alcanzada en la fermentación con solo aceite de canola (0.05 g/h). La velocidad de consumo fue mayor debido a que la concentración de OD en el reactor fue controlada por arriba del 40%,
25 eliminando la limitación de oxígeno disuelto durante el cultivo. Durante la segunda fase se adicionó al reactor sulfato de amonio a un flujo de 0.225 L/h, y a una concentración de 0.2 g/L. En la tercera fase se continuó adicionando al reactor sulfato de amonio, manteniéndose una concentración por arriba de 0.4 g/L de forma que en esta fase el estrés para la síntesis de PHAs por *W. eutropha* no fue causado por una limitación de
30 nitrógeno o de oxígeno en el medio de cultivo.

El estrés que provoca la síntesis de PHAs es causado por la falta de fosfatos, lo anterior debido a que durante el cultivo se utiliza fosfato de potasio para regular el pH del medio,

sin embargo éste no fue agregado posteriormente al medio, lo que indica que *W. eutropha* solamente utilizó el fosfato inicial, consumiéndolo hasta llegar a una limitación por fosfatos. Las principales diferencias encontradas en los PHAs producidos con las dos estrategias de fermentación se reflejan en la caracterización termoquímica de los biopolímeros
5 obtenidos (ver ejemplo 3).

Ejemplo 3. Caracterización de los PHAs obtenidos con el método de la invención.

Los resultados mostrados en los ejemplos anteriores, indicaron que *Wautersia eutropha* es capaz de utilizar aceites vegetales como fuente de carbono para producir PHAs. Debido a
10 que se ha reportado que la estructura de los esqueletos de carbono de los ácidos hidroxialcanoicos que se incorporan en el PHAs durante la fermentación está relacionada con los sustratos que se utilizan como precursores durante la síntesis de PHAs¹, la composición y características térmicas de los PHAs obtenidos mediante el método de la invención fueron determinadas por diferentes técnicas.

15

Extracción y purificación de PHAs obtenidos.

Para extraer los PHAs obtenidos mediante el método de la presente invención, las células previamente secas de *Wautersia eutropha*, fueron sometidas a ebullición en cloroformo durante 10 min. Al término del calentamiento las células fueron filtradas para remover la
20 biomasa del PHA, disuelto en cloroformo. Este último paso fue repetido dos veces más. Posteriormente se precipitó el PHA con hexano frío, se filtró y se eliminó el solvente residual por evaporación.

Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

25 Los PHAs purificados y obtenidos mediante el método de la invención fueron analizados por RMN para elucidar la estructura del biopolímero mediante la resonancia de los carbonos y protones presentes en la estructura de las unidades monoméricas de los PHAs obtenidos.

La identificación de las unidades monoméricas presentes en los PHAs producidos se
30 obtuvo analizando los espectros de ¹³C y ¹H, utilizando el biopolímero bacteriano poli(p-hidroxibutirato) (PHB de Goodfellow Cambridge Limited) como punto de comparación.

La RMN se realizó mediante un equipo Broker (DM X 500 MHz) empleando cloroformo deuterado como disolvente, obteniéndose espectros a 500 y 125 MHz de ^{13}C y ^1H , respectivamente. Los espectros correspondientes a ^1H fueron analizados con el programa Spinwoks versión 2.5.5.

- 5 Como se observa en la figura 10, los espectros de ^{13}C y ^1H del PHB puro mostraron las señales esperadas de acuerdo a lo reportado en la literatura^{19,20}, mientras que las señales de la cadena primaria del PHA producido mediante el método de la invención (ver figura 11) corresponden a las estructuras esperadas, coincidiendo con las estructuras reportadas¹⁷.
- 10 En la figura 11 se pueden observar los desplazamientos químicos dentro de los intervalos antes mencionados correspondientes a los carbonos de la cadena principal del PHA producido. También se observan señales correspondientes a carbonos de la cadena lateral, indicando la presencia de cuatro unidades monoméricas diferentes en el polímero sintetizado. Matsusaki²¹ reporta la resonancia de un grupo metilo con un desplazamiento
- 15 químico a 14 ppm correspondiente a un metilo terminal del hidroxioctanoato (C8) e hidroxidodecanoato (C12). También reportan a los metilenos del hidroxioctanoato e hidroxidodecanoato con un desplazamiento químico entre 22.66 - 34 ppm. Estos desplazamientos coinciden con los obtenidos en el espectro de ^{13}C de los PHAs sintetizados con el método de la invención, ya sea utilizando solo aceite de canola o
- 20 utilizando aceite de canola y fructosa; además de presentarse las señales que corresponden a hidroxialcanoatos de cadena corta como son PHB y polihidroxivalerato (C4 y C5, respectivamente).

El espectro de ^1H (figura 12) de los PHAs producidos por el método de la invención muestran los desplazamientos químicos esperados en un intervalo de 2.45 - 2.6 ppm, que

25 corresponden a los protones de metilenos de la cadena principal. El desplazamiento químico a 0.87 ppm indicó la presencia de protones de metilos terminales de cadena media, señal que se ha reportado como un grupo metilo unido a una cadena de 4 metilenos para el caso de hidroxioctanoato y 8 metilenos para hidroxidodecanoato. Además, se puede identificar un desplazamiento químico a 0.97 ppm que se identifica

30 como un grupo metilo correspondiente a un CH_3 de una cadena monomérica de PHV (polihidroxivalerato)^{22,23}.

Los espectros correspondientes a ^1H analizados con el programa Spinwoks, permitieron determinar el número de protones a las que se integra cada señal para así obtener el porcentaje relativo de las unidades de cadena media con respecto a PHB, demostrando que el porcentaje de unidades monoméricas de cadena media en el polímero obtenido utilizando aceite de canola y fructosa como fuentes de carbono mediante el método de la invención fue de 10%, mientras que para el polímero obtenido utilizando aceite de canola como única fuente de carbono solamente tuvo un 5% de unidades monoméricas de cadena media. Debido a esto, el contenido de PHA de cadena media es mayor para el polímero sintetizado con aceite de canola y fructosa que el obtenido únicamente con aceite de canola.

Por otra parte el desplazamiento químico para el PHB es la señal obtenida a 1.29 ppm como reportaron Gao²⁴ y Fukui¹⁹. Los datos teóricos y experimentales de los desplazamientos químicos de los espectros de ^{13}C y ^1H de los PHAs sintetizados con el método de la invención utilizando solo aceite de canola y, aceite de canola y fructosa se resumen en la tabla 6.

Por lo anterior es posible afirmar que los PHAs obtenidos mediante el método de la invención es un polímero formado por hidroxibutirato (HB), hidroxivalerato (HV), hidroxioctanoato (HO) e hidroxidodecanoato (HDD).

20 Espectroscopia de infrarrojo (FT-IR)

Los estudios de FT-IR se realizaron con un equipo Perkin Elmer (mod 1600) en una ventana de exploración de 400 a 4,000 cm^{-1} . Para la obtención de los espectros se realizaron 32 barridos por muestra, mientras que para su normalización se usó aire como referencia.

25 Los espectros FT-IR del PHB y de los PHAs obtenidos por el método de la invención en presencia de aceite de canola muestran las señales esperadas (ver figura 13) de acuerdo a lo reportado en la literatura, las cuales están asociadas a los grupos funcionales presentes en la estructura de los materiales. Esto implica que los espectros obtenidos muestran una superposición de las bandas vibracionales de los PHAs obtenidos y del PHB. Las principales bandas fueron observadas en el intervalo comprendido entre 4,000 a 650 cm^{-1} y se muestran en la tabla 7.

Tabla 6

Desplazamientos químicos en RMN de ^{13}C y ^1H para los PHAs sintetizados a partir de aceite de canola y aceite de canola-fructosa

5

10

15

20

25

30

^1H	δ (ppm)	δ (ppm) desplazamiento teórico	^{13}C	δ (ppm)	δ (ppm) desplazamiento teórico	
CH ₃	8-HO	0.87	(10,12)CH ₂	HDD	22.68	20-24
	12-HDD	0.87				
	3-PB	1.29	(10,12)CH ₂	HDD	14.12	13-15
	3-HV	0.97				
CH	8-HO	5.25	(9)CH ₂	HDD	29.59	28-29
	3-PB	5.33	(8)CH ₂	HDD	31.8	29
	3-HV	5.33		HO	14.12	13.5-14
CH ₂	8-HO	2.47, 2.61	(7)CH ₂	HDD	29.59	29
	3-PB	2.47, 2.61		HO	22.66	22.3-22.7
	3-HV	2.47, 2.61	(6)CH ₂	HDD	29.59	29
				HO	31.8	31
			(5)CH ₂	HDD	27.2	29-31
				HO	24.91	22-25
			(4)CH ₂	HDD	34.32	34-34.5
				HO	34	34-34.5
				HV	31.8	30-38
			(3)CH	HDD	76.9	65.5-71
				HO	67.5	65.5-71
				PB	67.5	65.5-71
				HV	67.5	65.5-71
			(2)CH ₂	HDD	39.32	38-41
				HO	40.88	38-41
				HB	40.88	38-41
				HV	40.88	38-41
			(1)C=O	12HDD	169	169-169.5
				8HO	169	169-169.5
				PB	169	169-169.5
				HV	169	169-169.5

Tabla 7

Principales señales de FT-IR obtenidas en los PHAs sintetizados a partir de aceite de canola, comparadas con señales reportadas para PHB como referencia

Grupo químico	Perteneciente a	Absorbancia
CH ₂ -CH ₂	PHA	2935
-CH ₂ -	PHB	2935
-CH ₂ -CH ₃	PHA	2874
-CH ₃	PHB, PHA	2978
-C=O	PHB, PHA	1739
O-C=O	PHB, PHA	1721
-C-O-C	PHB, PHA	1300-1000

5

10

El espectro característico de metilos y metilenos en los PHAs obtenidos y el PHB se puede observar en la región 3600-2600, donde diversos autores han reportado que las señales en las regiones 3015-2960, 2945-2925, y 2855-2875 cm⁻¹ corresponden al estiramiento de CH₃ asimétricos, CH₂ antisimétricos y CH₃ simétricos respectivamente²⁵.

En la figura 14 se observa el estiramiento simétrico de CH₃ en la región de 2870 cm⁻¹, en el que la intensidad de la banda está relacionada con el desorden conformacional obtenido en el proceso de cristalización²⁴, lo que indica que los PHAs obtenidos mediante el método de la presente invención son menos cristalinos que el PHB.

La banda a 2935 cm⁻¹ corresponde al estiramiento de cadenas de CH₂ antisimétricos, mostrando que en el PHA obtenido con aceite de canola y fructosa presenta una banda mas intensa que el PHA obtenido con solo aceite de canola y el PHB, estos grupos funcionales corresponden a las cadenas laterales de las unidades monoméricas. En el caso del PHA obtenido a partir de aceite de canola, esta señal indica una mayor cantidad de grupos metil asimétricos, contenidos en las cadenas monoméricas del PHA. La banda que corresponde a metilos asimétricos también es observada en el espectro a 2978 cm⁻¹. Esta banda es más intensa para el PHB, por lo que diferentes autores indican que esta señal se incrementa gradualmente con la presencia de estructuras cristalinas en el material²⁵. Además, recientemente se ha reportado la presencia de estiramientos de CH₃ asimétricos cerca de la región 3000 cm⁻¹ indicando la posible unión de C-H---O es decir,

de puentes de hidrógeno²⁴. Por esta razón el estiramiento en la región 2978 cm⁻¹ hace suponer la presencia de CH₃ interactuando con C=O.

En la región de 1850 a 1600 cm⁻¹ aparece el estiramiento del grupo C=O. Este ha sido reportado con dos bandas dominantes, ya que la señal a 1739 cm⁻¹ se asocia a regiones amorfas del PHA y la señal más definida a 1721 cm⁻¹ el C=O se asocia a grupos cristalinos^{22,25}. En la figura 15 se observan estas dos bandas, sin embargo la señal a 1921cm⁻¹ en los PHA obtenidos con aceite de canola y fructosa es más intensa que la de los dos materiales restantes. El porcentaje de cristalinidad fue estimado en 30% para ambos PHAs obtenidos y 58% para PHB.

10

Calorimetría diferencial de barrido (DSC).

Los estudios de DSC se realizaron en un calorímetro de barrido (Mettler Toledo DSC823). Con el fin de borrar la historia térmica, las muestras (4 mg aprox.) fueron enfriadas a -20°C para después ser calentadas a 180°C. Posteriormente se enfriaron rápidamente hasta -15 20°C manteniéndose 5 minutos a esta temperatura, para después efectuar el análisis térmico calentando lentamente hasta 180°C. La rampa de calentamiento usada fue de 5°C min⁻¹.

El porcentaje de cristalinidad se estimó a partir de las entalpías de fusión determinadas en el calorímetro. Las entalpías de fusión fueron utilizadas en la ecuación 1²⁶, tomando como base la entalpía de fusión del polímero 100% cristalino, suponiendo una entalpía de 146 J/g para PHB²⁷.

Ecuación 1

$$X_p = \Delta H_m / W_p \times \Delta H^{\circ}_m$$

25 donde:

X_p = cristalinidad del polímero (%)

ΔH_m = entalpía de fusión del polímero (J/g)

W_p = proporción del polímero en caso que se trate de una mezcla polimérica

ΔH[°]_m = entalpía de fusión del polímero 100% cristalino.

30 Los resultados de DSC muestran las señales que comprenden las temperaturas de fusión de los PHAs obtenidos. Los termogramas obtenidos indicaron una temperatura de fusión

(T_m) del PHB de 170°C con una ΔH_m de 84.74 Jg⁻¹ (ver figura 16), muy similar a lo reportado en la literatura²¹.

La temperatura de fusión (T_m) que presentan las muestras de los PHAs obtenidos con el método de la invención a partir de aceite de canola y fructosa y solo aceite de canola, fueron de 132°C y 150°C respectivamente con ΔH_m de 44.24 para ambos materiales. En la tabla 8 y la figura 16, se puede observar que con la incorporación de pequeños porcentajes de unidades monoméricas de cadena media, la temperatura de fusión de los PHAs es notablemente afectada.

Cuando los PHAs obtenidos según el método de la invención en presencia de aceite de canola llegan a su temperatura de fusión, se pueden observar señales dobles, lo que ha sido relacionado con una recristalización²⁸, es decir, la primera señal corresponde a la fusión del PHA y la segunda a una recristalización. En base a lo anterior es posible que pequeños cristales de PHB queden dispersos durante el proceso de enfriamiento y podrían ser sitios de nucleación para los monómeros de cadena más larga, de los cuales están formados los PHAs obtenidos según la invención.

Tabla 8
Comparación de temperaturas de fusión y entalpías

Muestra	Temperatura de fusión °C	ΔH_m (Jg ⁻¹)	Referencia
PHB	170	84.74	Presente invención
PHB	173.2	91	Matsusaki ²¹
PHA (aceite de canola)	134	45.24	Presente invención
PHA (aceite de canola, duplicado)	132	37.87	Presente invención
PHA (aceite de canola y fructosa)	150	44	Presente invención
PHA (aceite de canola y fructosa)	150	48	Presente invención
PHA (6% 6C-12C)	136	39	Matsusaki ²¹
PHA (5% 6C)	125	47	Loo ²⁹
PHA (5% 6C)	155	38	Loo ²⁹

Conforme a lo anterior, la caracterización química demostró que la incorporación de co-monomeros en los PHAS obtenidos mediante el método de la invención es dependiente del tipo de sustrato utilizado. Al realizar la producción de PHAs utilizando aceite de canola como única fuente de carbono se obtiene un 5% de unidades monoméricas de cadena media incorporadas en los PHAs de la invención, mientras que al combinar dos fuentes de carbono (fructosa y aceite de canola) se logra incorporar un 10% de unidades de cadena media en los PHAs de la invención.

Referencias

- 10 1. Steinbüchel A., et. al. 2003. Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms. *Biochemical Engineering Journal* 16: 81-96.
2. Srivastava A., et. al. 2005. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochemistry* 40: 607-619.
- 15 3. Madison L, et. al. 1999. Metabolic Engineering of Poly(3-Hidroxyalkanoates): From DNA to Plastic. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 63:21-53.
4. Potter M., et. al. 2005. Poly(3-hydroxybutyrate) granule-associated proteins: Impact on poly(3-hydroxybutyrate) synthesis and degradation. *Biomacromolecules* 6: 552-560.
5. Ojumu T, et. al. 2004. Production of Polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer. *African Journal of Biotechnology* 3: 18-24
- 20 6. Reddy C, et. al. 2003. Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresource technology*. 87: 137-146.
7. Kanegafuchi Chem, Ind. Co. LTD , JP05-93049.
8. Kanegafuchi Chem, Ind. Co. LTD , JP07-265065.
- 25 9. Baanaado, Uizoruto, et. al. 1988. Production of polyester by enzyme, production of optically active carboxylic acid and ester and polyester-containing product, JP2642937.
10. Ramsay B, et.al. 1992. *Appl. Environ. Microbiol*, 58(2), 746.
11. Abe H, et.al. 1994 *Int. J. Biol. Macromol.*, 16(3), 119.
12. Yu J, et. al. 2002. Kinetics modeling of inhibition and utilization of mixed volatile fatty acids in the formation of polyhydroxyalkanoates by *Ralstonia eutropha*. *Process Biochemistry* 37: 731-738.
- 30

13. Pradella Jose Geraldo Da Cruz, et. al. 2007. Processo de produção de polihidroxicanoatos a partir de óleos vegetais, BRPI0504054.
14. Bright Simon, et. al. 1992. Production of polyhydroxyalkanoate in plants, WO9219747.
15. Nagaoka, Tetsuya. 2007. New method for producing biodegradable polyester,
5 JP2007259708.
16. Xi J, et. al. 2001. Hyperproduction of polyesters consisting of medium-chain-length hydroxyalkanoate monomers by strain *Pseudomonas stutzeri* 1317. *Antonie van Leeuwenhoek* 78: 43–49.
17. Shang L, et. al. 2004. Sequential feeding of glucose and valerate in a fed-batch culture
10 of *Ralstonia eutropha* for production of poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) with high 3-hydroxyvalerate fraction. *Biotechnology Progress* 20:140-144.
18. Yan Q, et. al., 2003. Biosynthesis of polyhydroxyalkanoates (PHAs) with continuous feeding of mixed organic acids as carbon sources by *Ralstonia eutropha*. *Process Biochemistry* 39: 387-391.
- 15 19. Fukui T, et. al. 1998. Efficient production of polyhydroxyalkanoates from plant oils by *Alcaligenes eutrophus* and its recombinant strain. *Applied Microbiology Biotechnology* 49: 333-336.
20. Fukui T, et. al. 1998. Morphological and ¹³C-nuclear magnetic resonance studies for polyhydroxyalkanoate biosynthesis in *Pseudomonas sp.* 61-3. *FEMS Microbiology Letters* 164: 219-225.
20
21. Matsusaki H, et. al. 2000. Biosynthesis and properties of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyalkanoates) by recombinant strains of *Pseudomonas sp.* 61-3. *Biomacromolecules* 1:17-22.
22. Gracida J, et. al. 2002. Synthesis and characterization of poly(3-hidroxibutyrate-co-3-
25 hydroxyvalerate) (PHBHV) copolymer produced in sequential feeding fed bath cultures of *Ralstonia eutropha*. *International Journal of Polymeric Materials*. 51: 607-617.
23. Rozsa G, et. al. 1999. Caracterización mediante espectroscopía de RMN de una familia de polihidroxicanoatos. *Revista CENIC Ciencias Químicas* 30:28-30.
24. Gao Y, et. al. 2006. Improvement of mechanical properties of poly(DL-lactide) films by
30 blending of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). *European Polymer Journal* 42: 764–775.

25. Conti D, et. al. 2006. Miscibility and crystallinity of poly (3-hydroxybutyrate)/poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) blends. *Termochim Acta* 450: 61-66.
26. Nojima S, et. al. 2005. Crystallitation behavior of poly (ε-caprolactone) blocas starting from polyethylene lamellar morphology in porly(ε-caprolactone)-block-polyethylene copolymers. *Polymer* 46:4060-067.
27. Gunaratne L, et. al. 2004. Thermal history effects on crystallization and melting of poly(3-hidroxybutyrate) *Thermochemical Acta* 423: 127-135.
28. Furukawa T, et. al. 2005. Structure, dispersibility, and crystallinity of poly(hydroxybutyrate)/poly(L-lactic acid) blends studied by FT-IR microspectroscopy and differential scanning calorimetry. *Macromol* 38: 6445-6454.
29. Loo C, et. al. 2005. Biosynthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from palm oil products in a *Wautersia eutropha* mutant. *Biotechnology Letters* 27: 1405–1410.

15

20

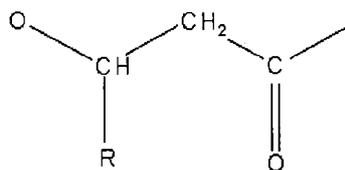
25

30

Reivindicaciones

1. Un poli-3-hidroxiálcanoato con unidades monoméricas repetidas de fórmula

5



caracterizado porque comprende 5 a 10% de unidades monoméricas donde R es un grupo alquilo de 3 a 9 carbonos y 90 a 95% de unidades monoméricas donde R es un grupo alquilo de 1 a 2 carbonos.

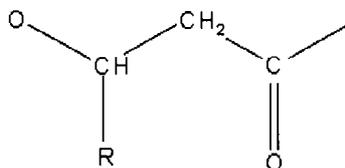
10

2. El poli-3-hidroxiálcanoato de la reivindicación 1 caracterizado porque comprende 5 a 10% de unidades monoméricas donde R es un grupo alquilo de 5 a 9 carbonos y 90 a 95% de unidades monoméricas donde R es un grupo alquilo de 1 a 2 carbonos.
3. El poli-3-hidroxiálcanoato de la reivindicación 2 caracterizado porque comprende 5 a 10% de unidades monoméricas donde R es pentilo ó nonilo y 90 a 95% de unidades monoméricas donde R es metilo o etilo.
4. El poli-3-hidroxiálcanoato de la reivindicación 3 caracterizado porque comprende 5 a 10% de unidades monoméricas de 3-hidroxióctanoato y 3-hidroxi-dodecanoato y 90 a 95% de unidades monoméricas de 3-hidroxi-butirato y 3-hidroxi-valerato.
5. El poli-3-hidroxiálcanoato de la reivindicación 1 caracterizado porque tiene un punto de fusión de 130 a 150°C.
6. Un método para la obtención de poli-3-hidroxiálcanoatos que comprenden en su estructura unidades monoméricas repetidas de fórmula

15

20

25



donde R es un grupo alquilo de 3 a 9 carbonos, caracterizado porque comprende las etapas de:

30

- a) Crecer en un medio de cultivo un microorganismo productor de poli-3-hidroxicanoatos en presencia de un sacárido y una fuente de nitrógeno hasta que la concentración inicial del sacárido se reduzca en al menos 80%,
 - b) Adicionar sacárido y una fuente de nitrógeno al medio de cultivo en concentraciones tales que permitan un incremento en la biomasa total de al menos 130% con respecto de la biomasa total generada en la etapa a),
 - c) Adicionar aceite vegetal al medio de cultivo como fuente de carbono bajo limitación de nitrógeno o fósforo e incubar hasta obtener una acumulación del 90% en peso seco del poli-3-hidroxicanoato, y
 - d) Recuperar el poli-3-hidroxicanoato del medio de cultivo.
7. El método de la reivindicación 6, caracterizado porque el microorganismo productor de poli-3-hidroxicanoatos se selecciona del grupo que comprende *Wautersia*, *Klebsiella*, *Zoogloea*, *Bacillus*, *Aeromona*, *Azotobacter*, *Clostridium*, *Nocardia*, *Halobacterium*, *Burkholderia*, *Sphaerotilus* y *Pseudomona*.
 8. El método de la reivindicación 7, caracterizado porque el microorganismo productor de poli-3-hidroxicanoatos es *Wautersia*.
 9. El método de la reivindicación 6, caracterizado porque el sacárido se selecciona del grupo que comprende arabinosa, glucosa, manosa, fructosa, galactosa, sorbitol, manitol e inositol.
 10. El método de la reivindicación 9, caracterizado porque el sacárido es fructosa.
 11. El método de la reivindicación 9, caracterizado porque en la etapa a) el sacárido se encuentra en una concentración de 2 a 18 g/L.
 12. El método de la reivindicación 6, caracterizado porque la fuente de nitrógeno se selecciona del grupo que comprende amoníaco, sal de amonio, sulfato de amonio, urea, caseína, peptona, extracto de levadura y extracto de carne.
 13. El método de la reivindicación 12, caracterizado porque la fuente de nitrógeno es sulfato de amonio.
 14. El método de la reivindicación 12, caracterizado porque en la etapa a) la fuente de nitrógeno se encuentra en una concentración de 1 a 20 g/L.
 15. El método de la reivindicación 6, caracterizado porque en la etapa b) el sacárido se adiciona a una concentración final de 2 a 40 g/L y la fuente de nitrógeno a una concentración final de 0.2 a 0.25 g/L.

16. El método de la reivindicación 6, caracterizado porque el aceite vegetal se selecciona del grupo que comprende aceite de canola, soya, olivo, maíz, cártamo, girasol y mezclas de los mismos.
- 5 17. El método de la reivindicación 16, caracterizado porque el aceite vegetal es aceite de canola.
18. El método de la reivindicación 6, caracterizado porque en la etapa c), el aceite vegetal se adiciona a una concentración final de 40 a 60 g/L.
19. El método de la reivindicación 6, caracterizado porque en la etapa d) el poli-3-hidroxicanoato se recupera mediante separación de las células del medio de cultivo,
10 posterior rompimiento de éstas y extracción final con cloroformo.
20. El método de la reivindicación 6, caracterizado porque las fuentes de carbono y nitrógeno se suministran mediante flujos continuos de aproximadamente 0.7 a 0.9 L/h.
21. El método de la reivindicación 6, caracterizado porque la relación C/N en el medio de cultivo se mantiene a una C/N = 14 durante la etapa a), mientras que en la etapa c) se
15 mantiene a una C/N = 120.
22. El método de la reivindicación 15, caracterizado porque el sacárido se adiciona a una concentración final de 2 g/L y la fuente de nitrógeno a una concentración final de 0.25 g/L.
23. El método de la reivindicación 22, caracterizado porque el poli-3-hidroxicanoato que
20 se obtiene comprende 5% de unidades monoméricas donde R es un grupo alquilo de 3 a 9 carbonos y 95% de unidades monoméricas donde R es un grupo alquilo de 1 a 2 carbonos.
24. El método de la reivindicación 15, caracterizado porque el sacárido se adiciona a una concentración final de 30 a 40 g/L y la fuente de nitrógeno a una concentración final
25 de 0.2 g/L.
25. El método de la reivindicación 24, caracterizado porque en la etapa c) la fuente de nitrógeno se adiciona a una concentración final mínima de 0.4 g/L.
26. El método de la reivindicación 25, caracterizado porque el poli-3-hidroxicanoato que
30 se obtiene comprende 10% de unidades monoméricas donde R es un grupo alquilo de 3 a 9 carbonos y 90% de unidades monoméricas donde R es un grupo alquilo de 1 a 2 carbonos.

Resumen.

La presente invención describe métodos eficientes de fermentación de bajo costo para la producción eficiente de poli-3-hidroxicanoatos (PHAs) de cadena media que comprenden el crecimiento de microorganismos productores de PHAs utilizando aceites vegetales como fuente de carbono, ya sea en presencia ó ausencia de sacárido. Los métodos de la
5 invención comprenden producir biomasa en cultivo por lote, posteriormente producir biomasa en lote alimentado mediante la adición de sacárido y una fuente de nitrógeno al medio de cultivo y finalmente producir PHAs mediante la adición de aceite vegetal como fuente de carbono bajo limitación de nitrógeno o fósforo. Mediante el método de la
10 invención, se obtiene al menos un 90% en peso seco de PHAs de cadena media del medio de fermentación, presentando de 5 a 10% de unidades monoméricas de cadena media en su estructura.

15

20

25

30

FIGURA 1

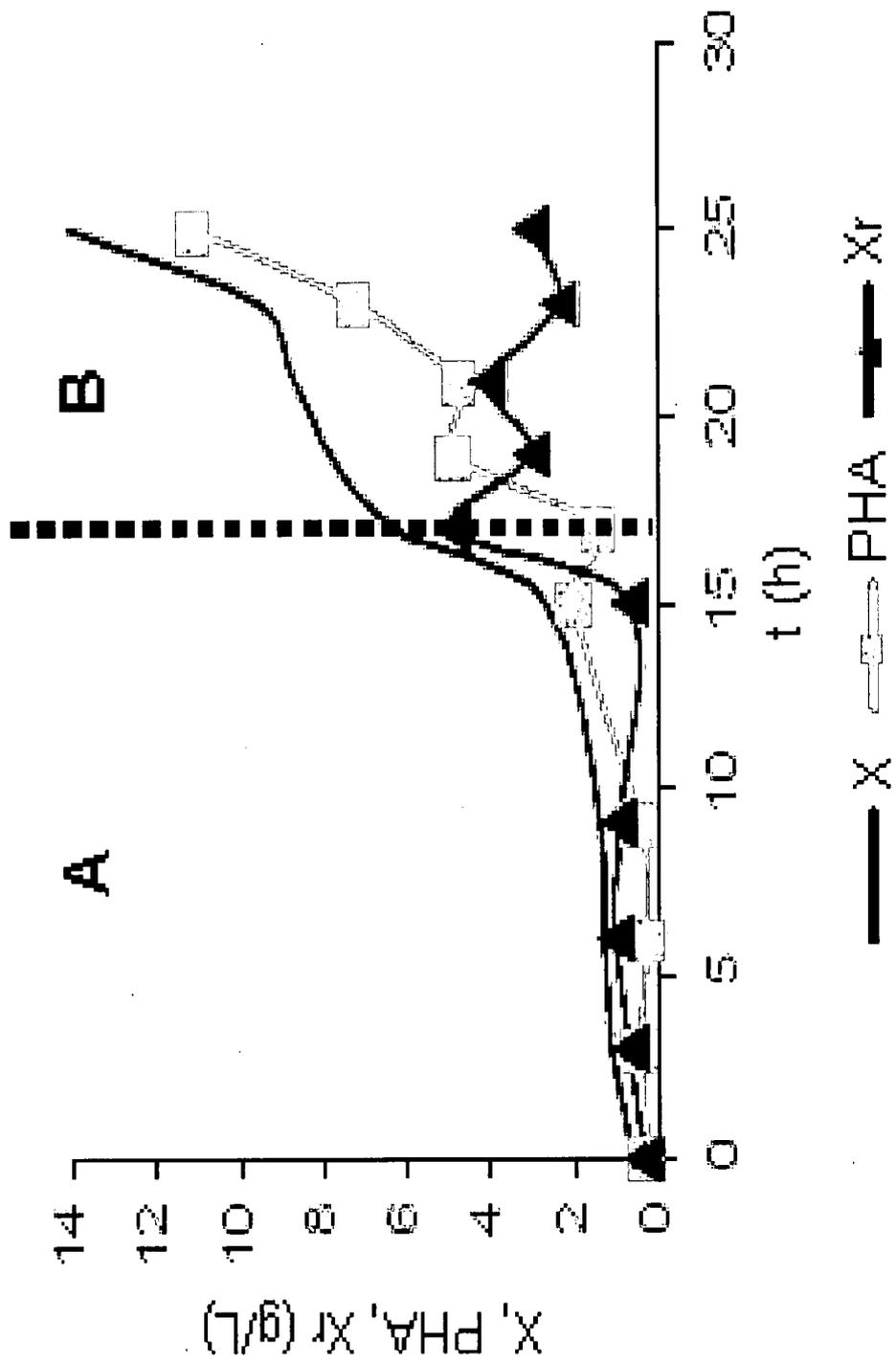


FIGURA 2

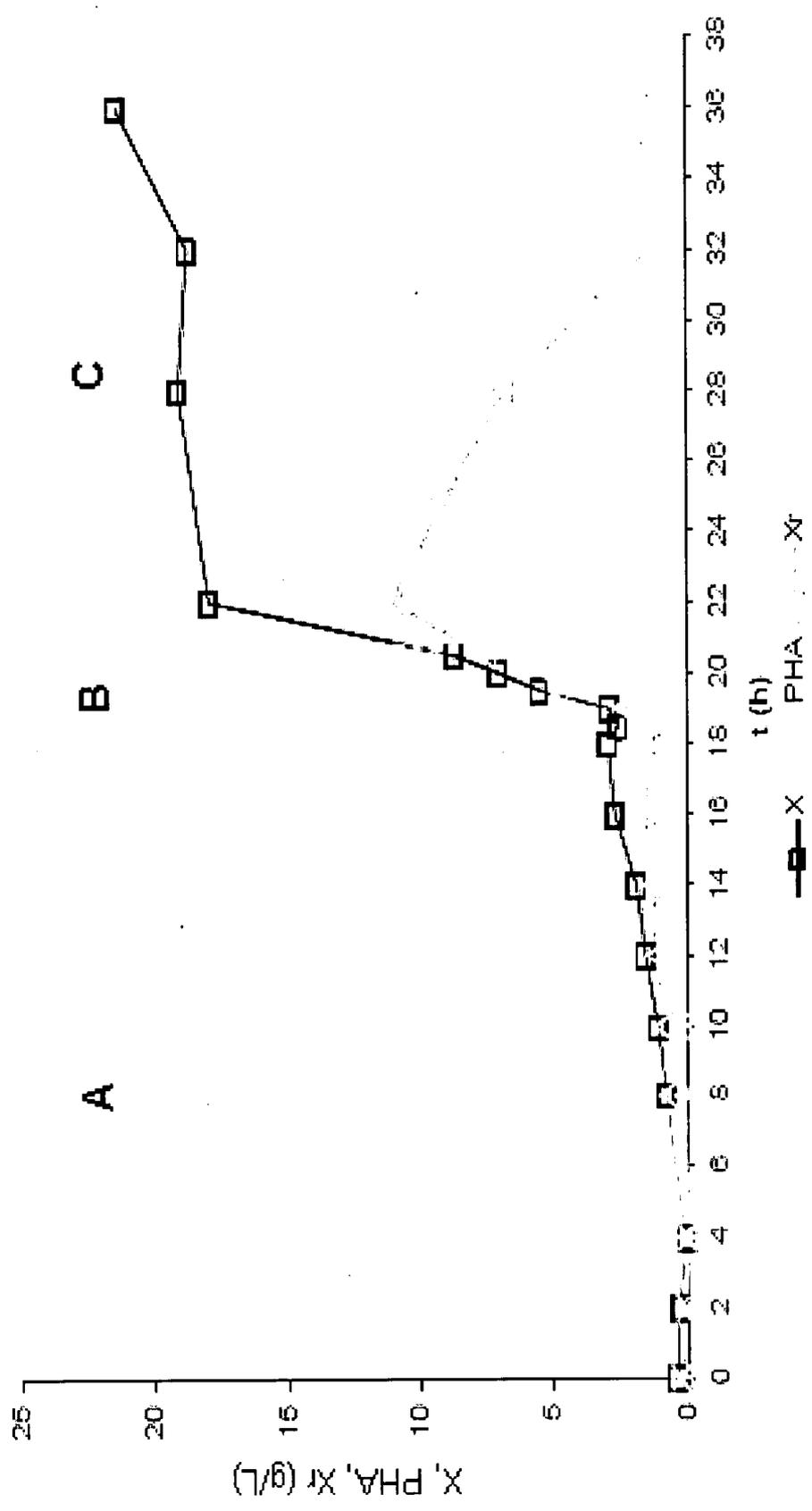


FIGURA 3

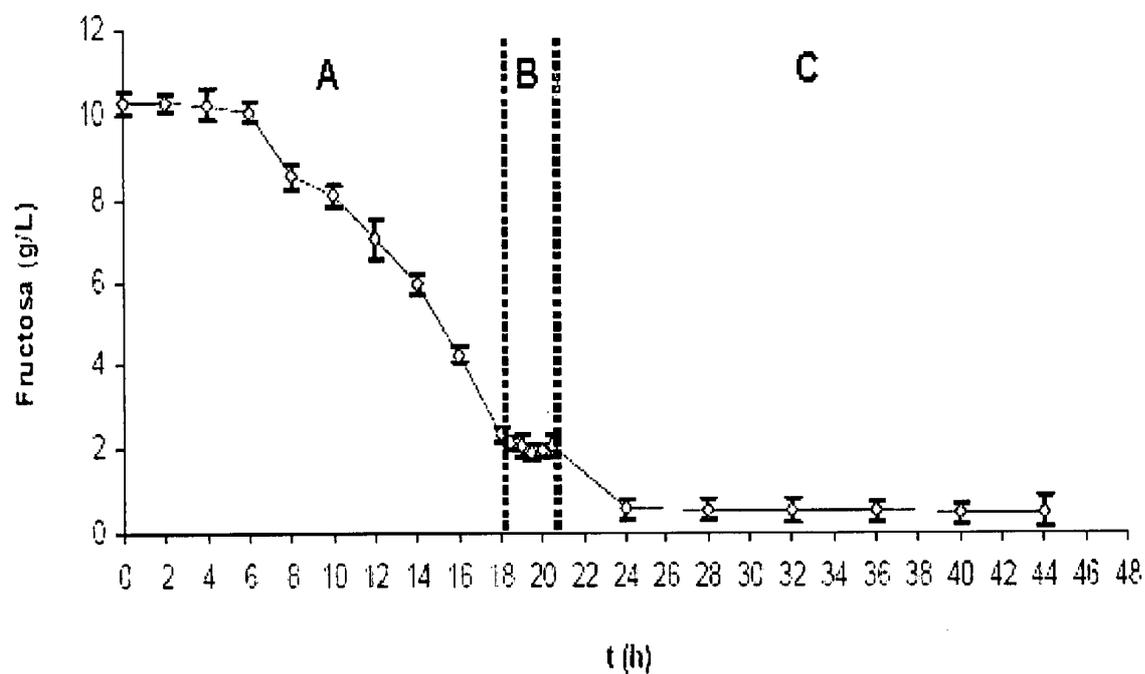


FIGURA 4

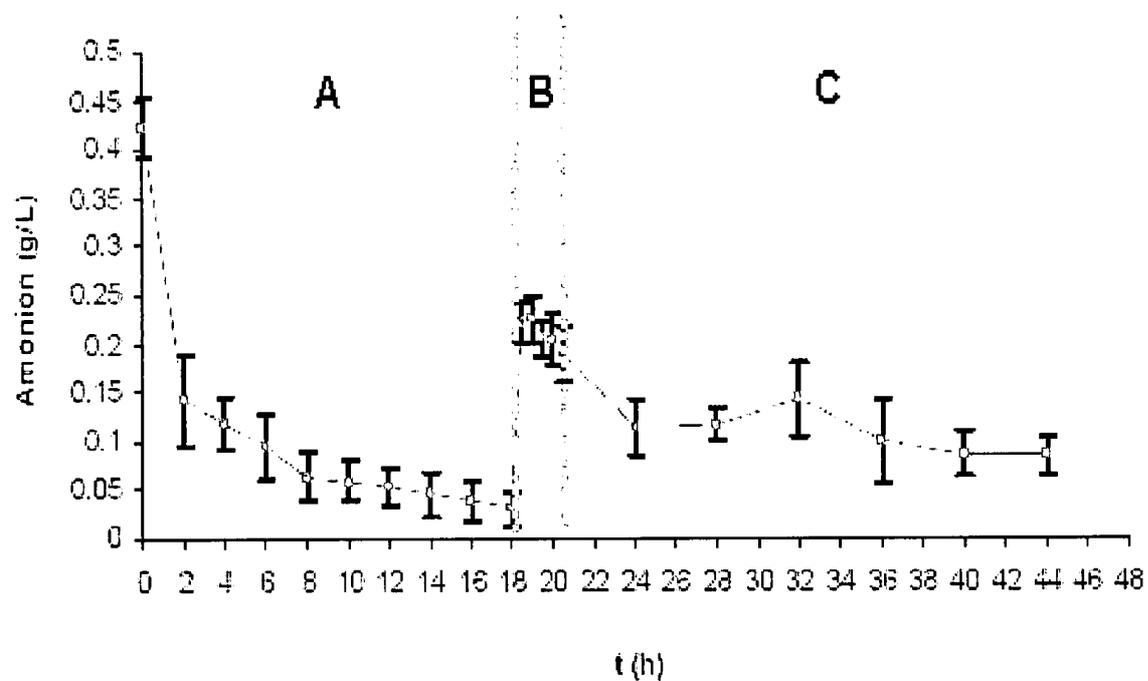


FIGURA 5

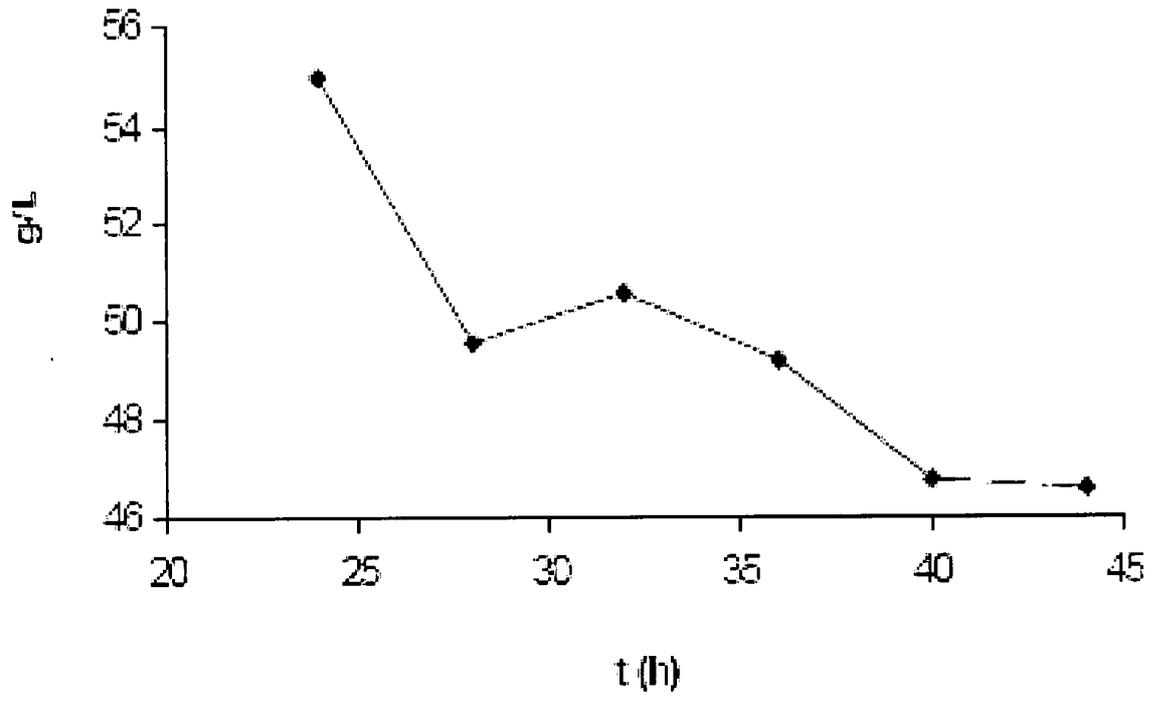


FIGURA 6

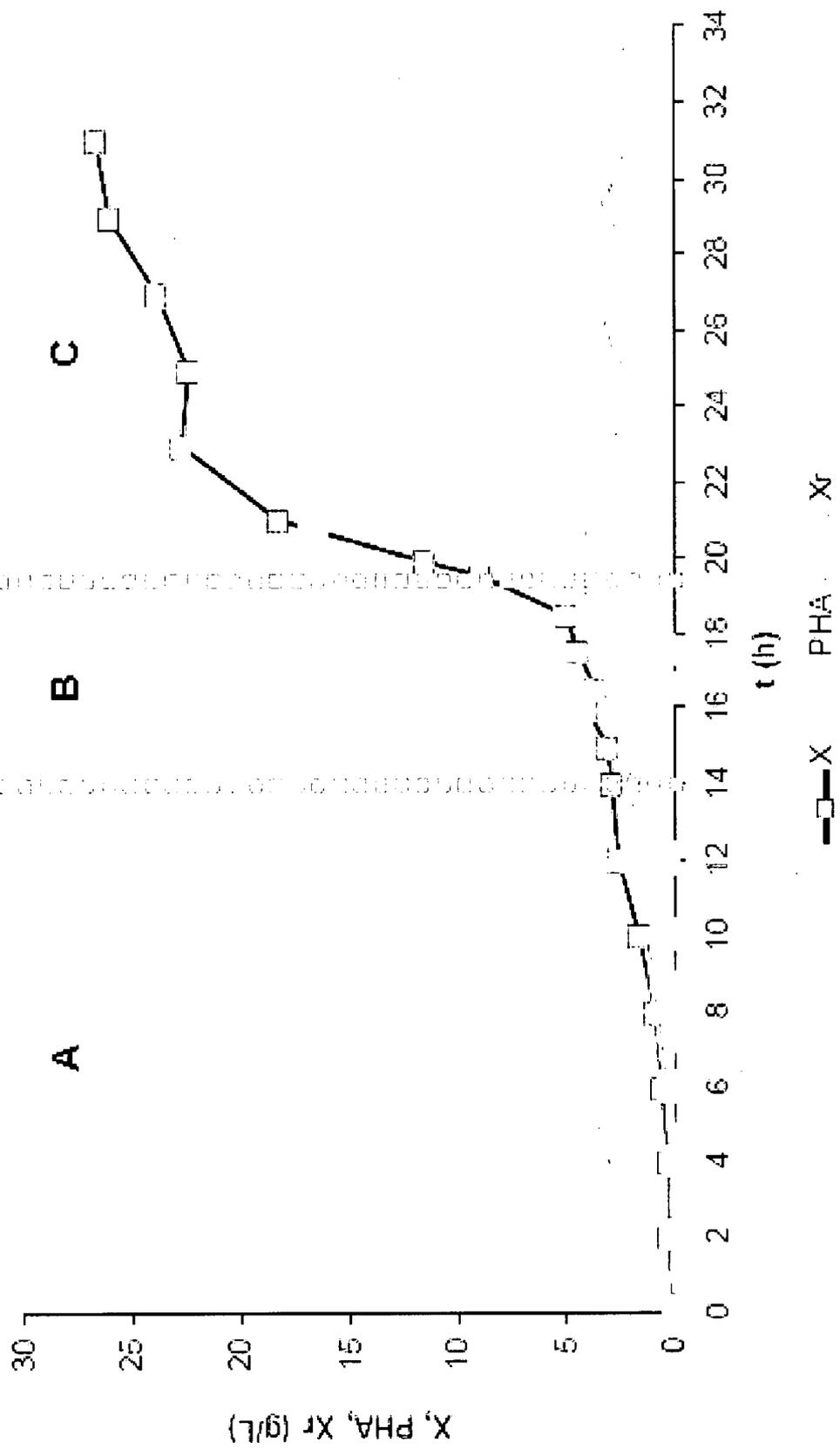


FIGURA 7

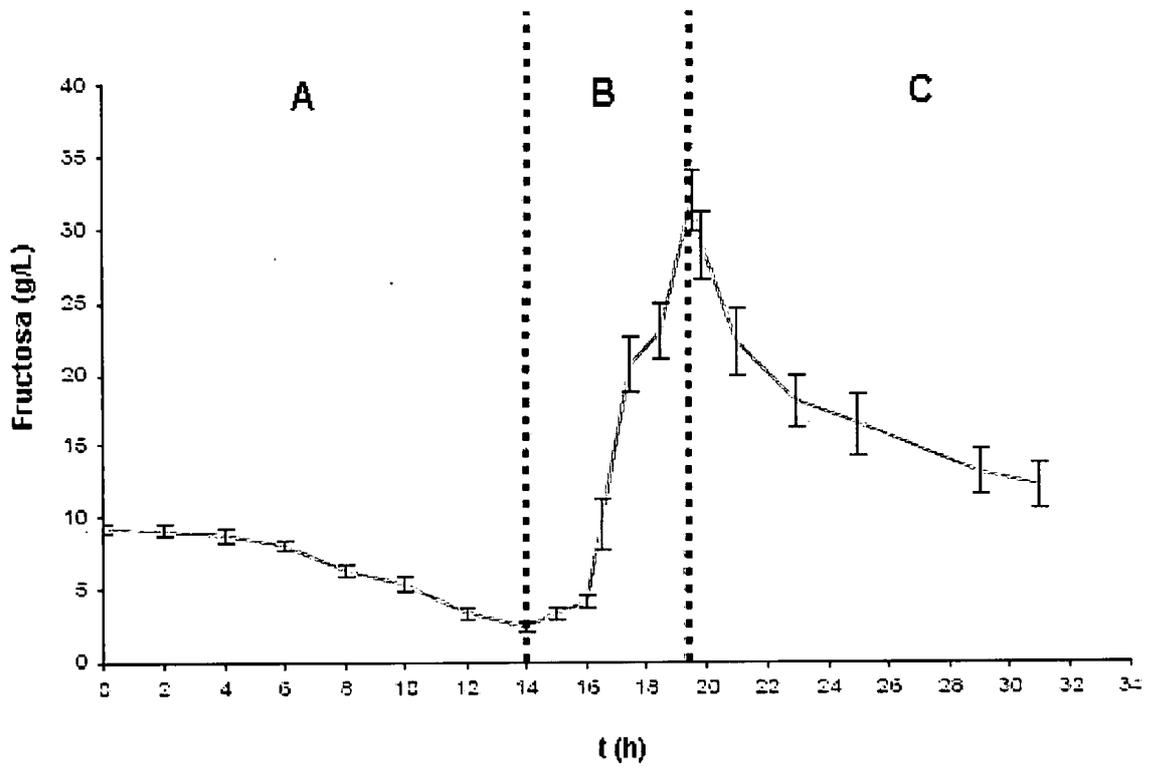


FIGURA 8

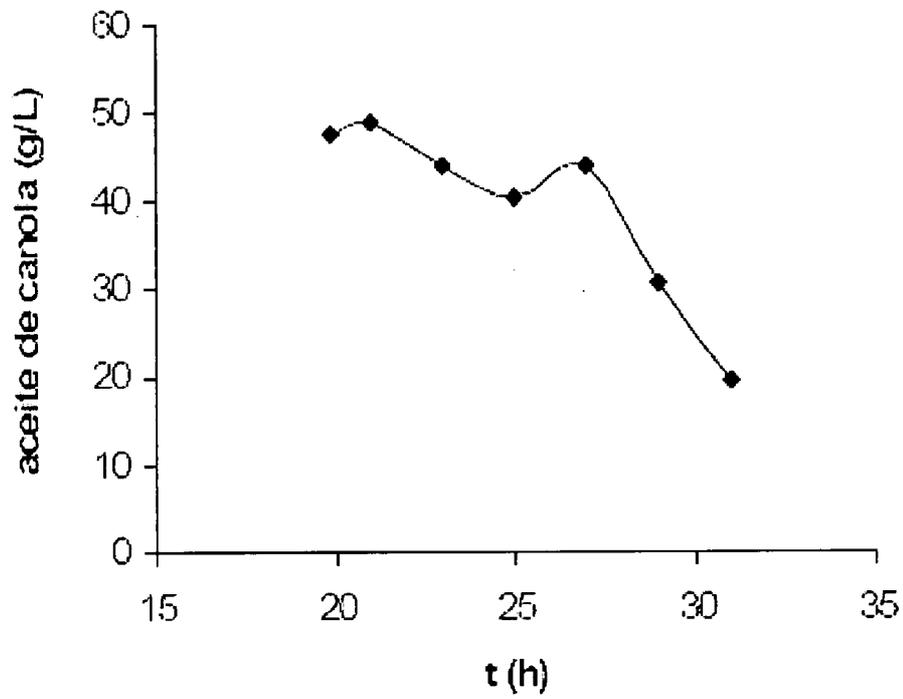


FIGURA 9

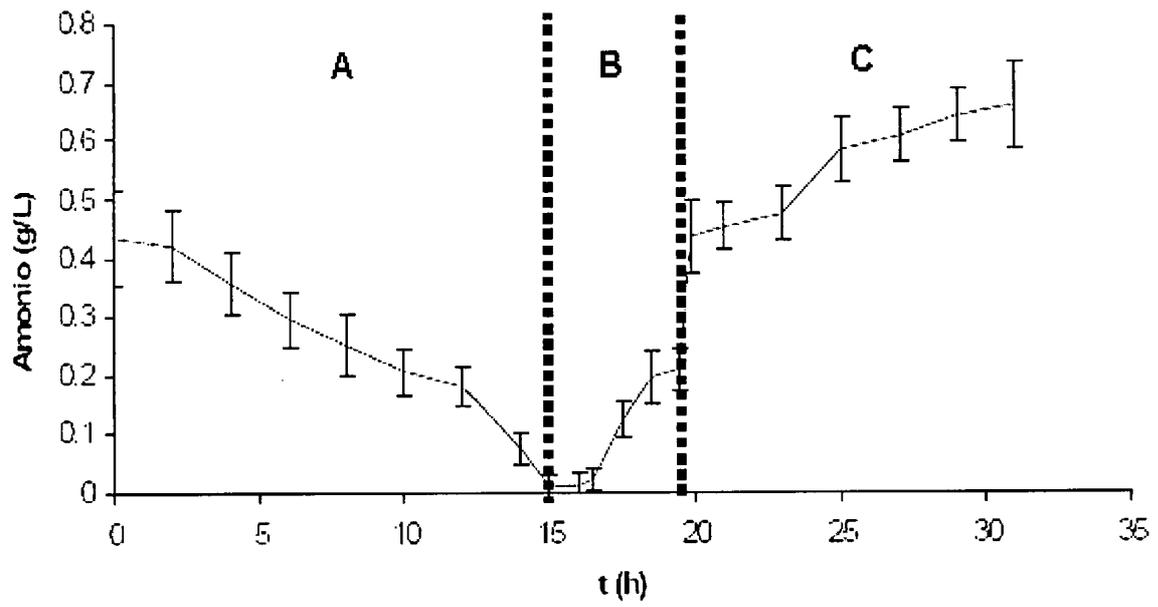


FIGURA 10a

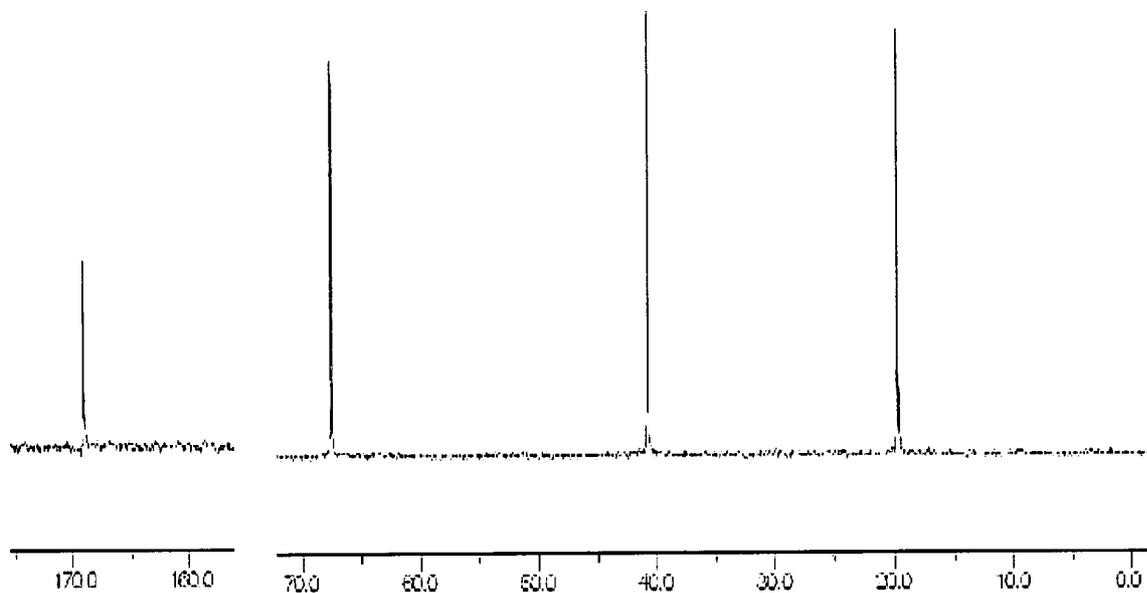


FIGURA 10b

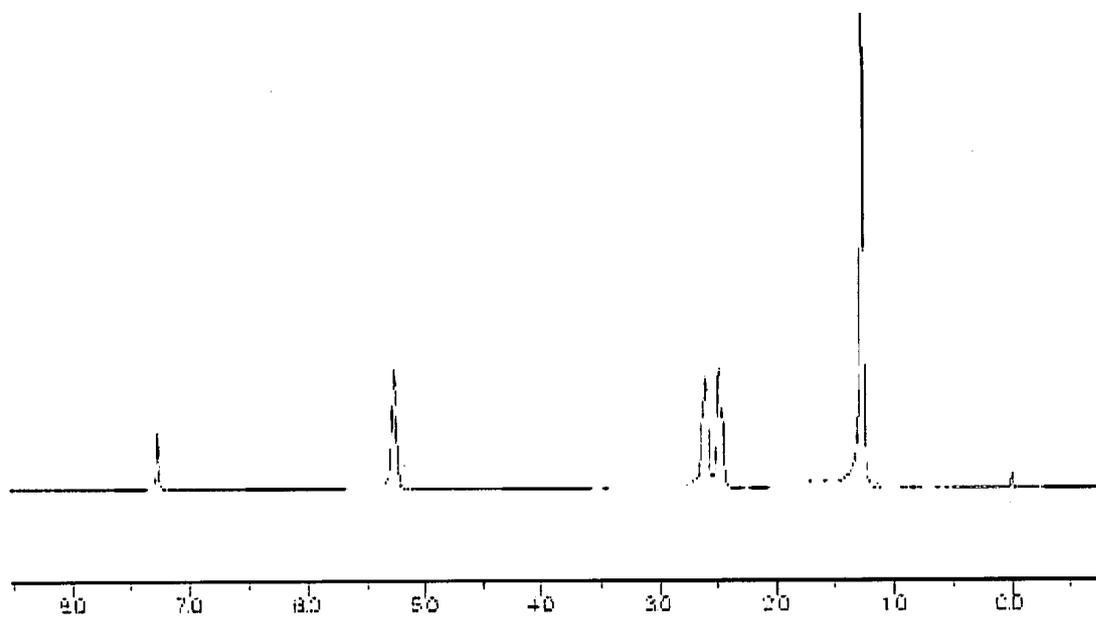


FIGURA 11a

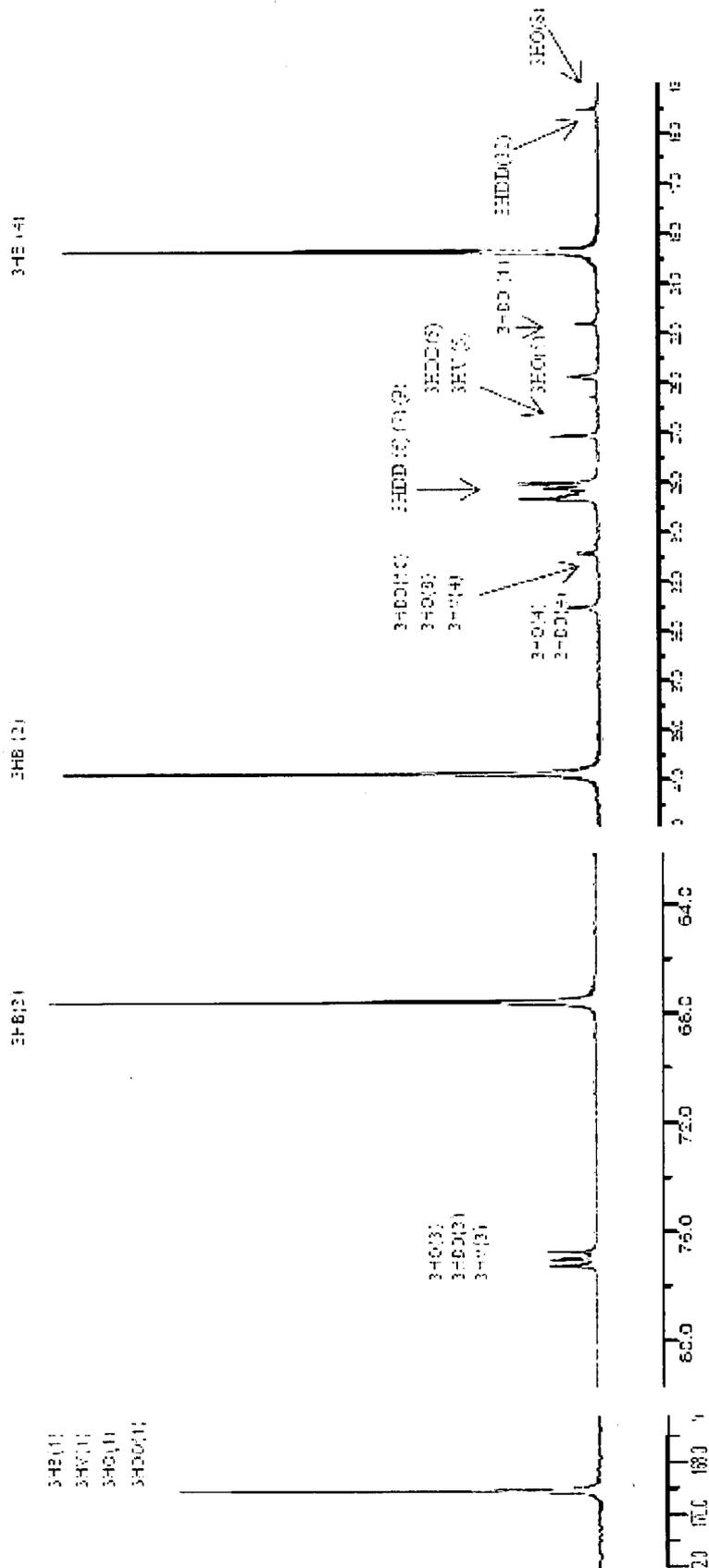


FIGURA 11b

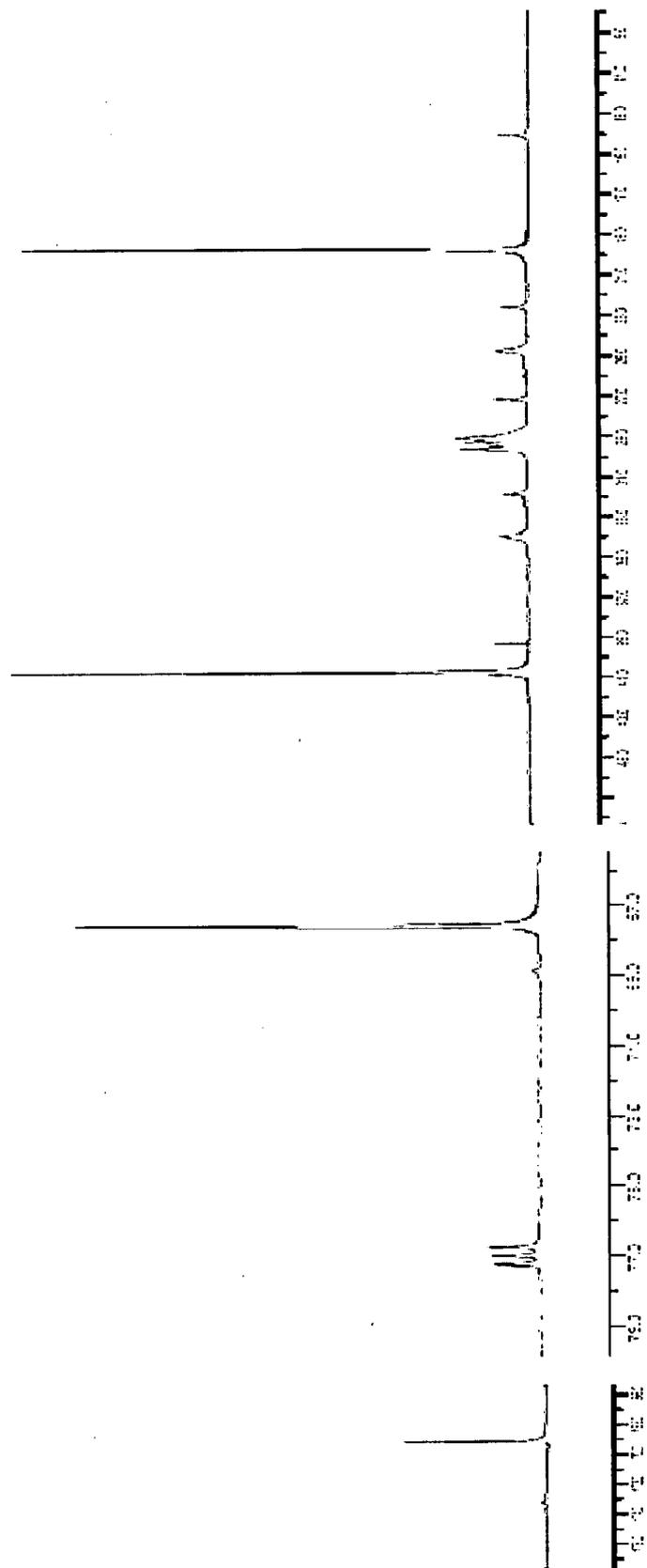


FIGURA 12

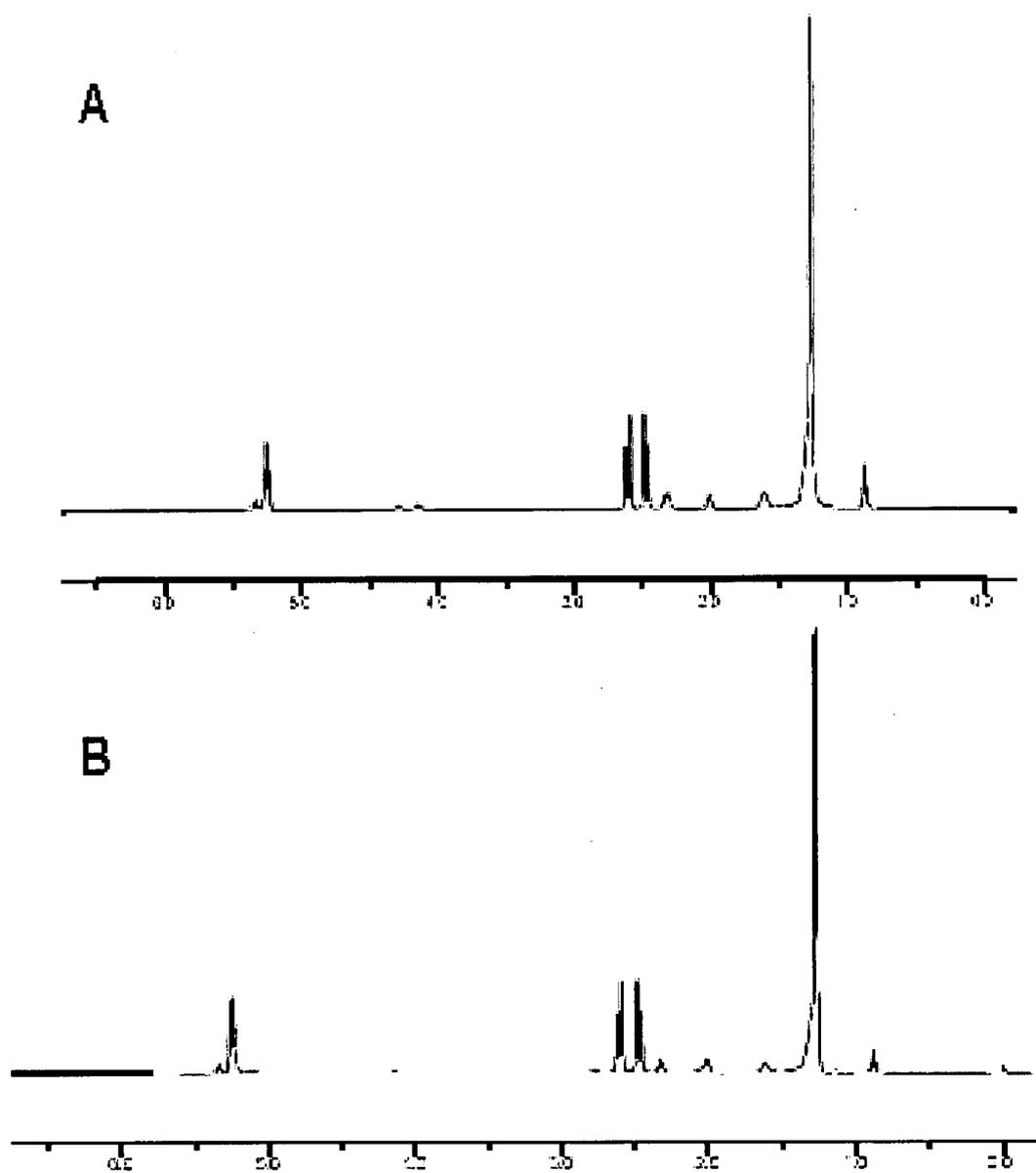


FIGURA 13

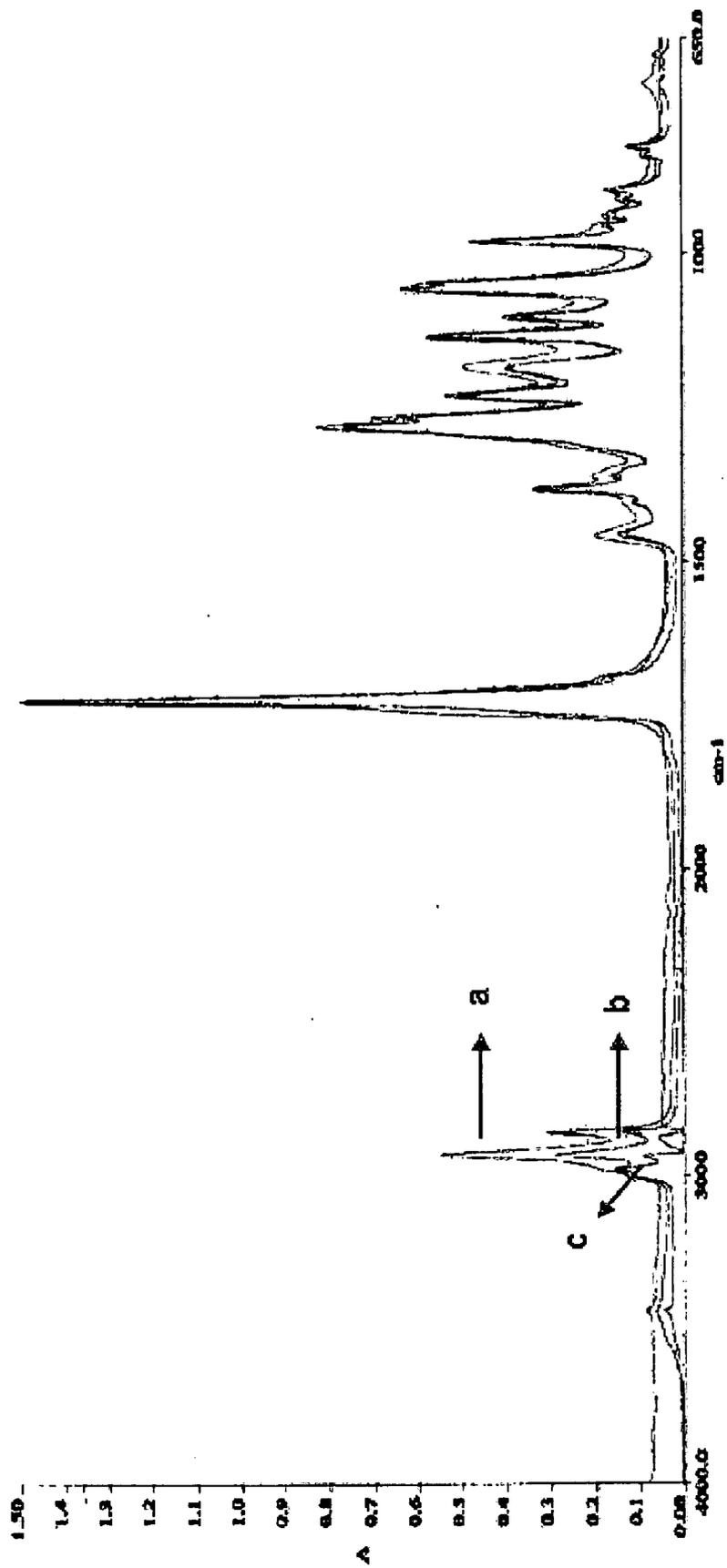


FIGURA 14

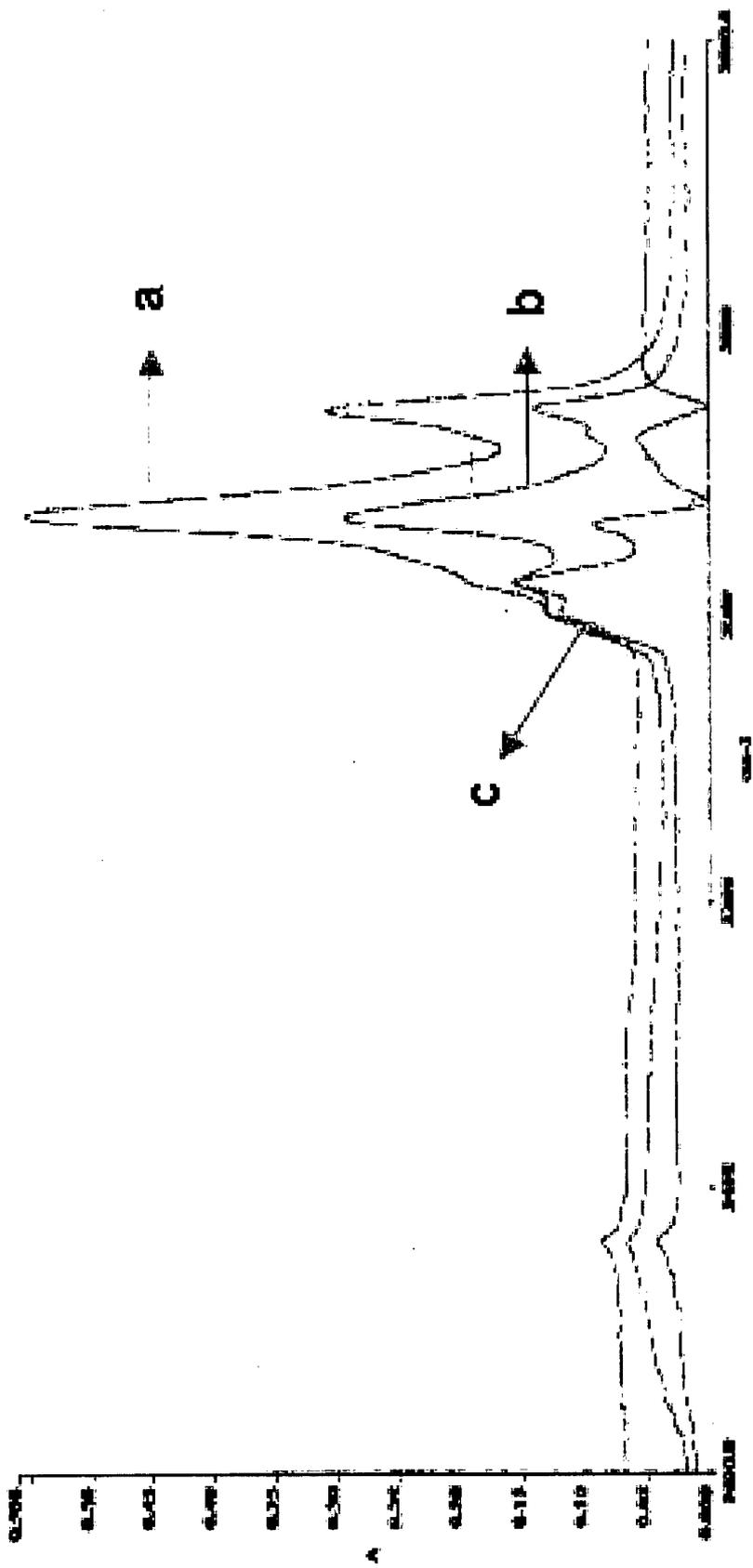


FIGURA 15

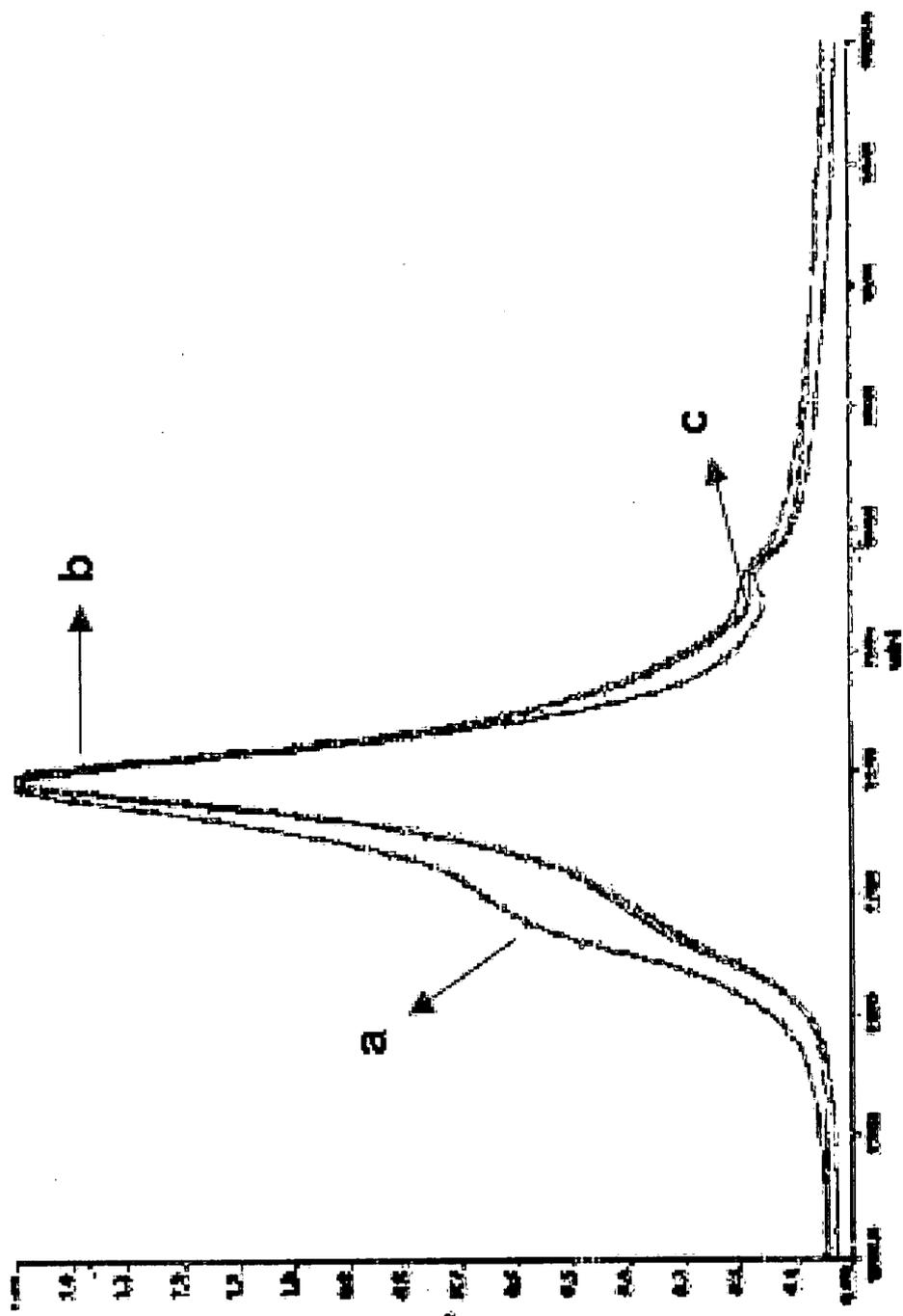


FIGURA 16

