

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
10 de abril de 2014 (10.04.2014)

WIPO | PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2014/053687 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
C12P 39/00 (2006.01) C12N 1/06 (2006.01)
C12P 7/62 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2013/070674

(22) Fecha de presentación internacional:
30 de septiembre de 2013 (30.09.2013)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P201231516 1 de octubre de 2012 (01.10.2012) ES

(71) Solicitantes: **CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC)** [ES/ES]; Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES). **YISSUM RESEARCH DEVELOPMENT COMPANY OF THE HEBREW UNIVERSITY OF JERUSALEM, LTD** [IL/IL]; Hi-Tech Park, Edmond J. Safra Campus, Givat Ram, P.O. Box 39135, 91390 Jerusalem (IL).

(72) Inventores: **MARTÍNEZ LÓPEZ, Virginia**; Centro de Investigaciones Biológicas (CIB), Ramiro de Maeztu, 9, E-28040 Madrid (ES). **PRIETO JIMÉNEZ, María Auxiliadora**; Centro de Investigaciones Biológicas (CIB), Ramiro de Maeztu, 9, E-28040 Madrid (ES). **GARCÍA LÓPEZ, José Luis**; Centro de Investigaciones Biológicas (CIB), Ramiro de Maeztu, 9, E-28040 Madrid (ES). **JURKEVITCH, Edouard**; The Hebrew University of Jerusalem, The Department of Plant Pathology and Microbiology, Faculty of Agriculture, Food and

Environment, Hi-Tech Park, Edmond J. Safra Campus, Givat Ram, P.O. Box 39135 91390 Jerusalem (IL).

(74) Mandatario: **UNGRIA LÓPEZ, Javier**; Avenida Ramón y Cajal, 78, E-28043 Madrid (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

— con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))

(54) Title: FERMENTATION METHOD FOR PRODUCING POLYHYDROXYALKANOATES AND DERIVATIVES WHICH COMPRISES THE USE OF BACTERIAL PREDATORS

(54) Título : PROCEDIMIENTO DE FERMENTACIÓN PARA LA PRODUCCIÓN DE POLIHIDROXIALCANOATOS Y DERIVADOS QUE COMPRENDE LA UTILIZACIÓN DE PREDADORES BACTERIANOS

(57) Abstract: Method for the extraction of a bioproduct selected from the group comprising polyhydroxyalkanoate (PHA), PHA hydrolysate, and any mixture thereof, obtained by fermentation of a prey producer bacterium, said extraction method being characterized in that it comprises mixing the prey producer bacterium containing the bioproduct within it with a predator bacterium in a medium comprising a source of Ca and Mg. Preferably, the predator bacterium is *Bdellovibrio bacteriovorus* HD100 and the prey producer bacterium is *Pseudomonas putida* KT2440 or *Cupriavidus necator* H16. In addition, a description is given likewise of a method for producing the bioproduct comprising the extraction by means of the method of the invention.

(57) Resumen: Procedimiento de extracción de un bioproducto seleccionado del grupo que consiste en polihidroxialcanoato (PHA), hidrolizado de PHA y una cualquiera de sus mezclas, y obtenido por fermentación de una bacteria productora presa, caracterizado dicho procedimiento de extracción porque comprende mezclar la bacteria productora presa que contiene el bioproducto en su interior con una bacteria depredadora en un medio que comprende una fuente de Ca y Mg. Preferiblemente la bacteria depredadora *Bdellovibrio bacteriovorus* HD100 y la bacteria productora presa es *Pseudomonas putida* KT2440 ó *Cupriavidus necator* H16. Adicionalmente, también se describe un método de obtención del bioproducto que comprende la extracción por el procedimiento de la invención.



WO 2014/053687 A1

**PROCEDIMIENTO DE FERMENTACIÓN PARA LA PRODUCCIÓN DE
POLIHIDROXIALCANOATOS Y DERIVADOS QUE COMPRENDE LA UTILIZACIÓN
DE PREDADORES BACTERIANOS**

5

DESCRIPCIÓN

SECTOR DE LA TÉCNICA

Uno de los objetos de la presente invención es un procedimiento
10 de producción de polihidroxialcanoatos y derivados por
fermentación bacteriana en el que se facilita la extracción del
producto mediante la lisis de la bacteria productora con una
bacteria predadora, y por tanto, se incluye en el área de la
Biotecnología Industrial en el sector de la Industria Química, y
15 en particular de la denominada Química Sostenible o Química
Verde, pudiendo afectar tanto al subsector de las sustancias
químicas primarias como al subsector de las sustancias químicas
especializadas.

20 **ESTADO DE LA TÉCNICA**

La biotecnología de los bioprocesos industriales está
experimentado en los últimos años avances considerables para
mejorar y adaptar las modernas técnicas de la biología molecular
25 y de la microbiología a las tecnologías clásicas de
fermentación. En este sentido, la tecnología del DNA
recombinante o, en un concepto más amplio, las técnicas de
biología molecular, han sido determinantes para que podamos
explotar y manipular un gran número de organismos para la
30 producción de sustancias de interés. En gran medida, este éxito
ha sido posible gracias al desarrollo de sistemas para expresión
de genes en organismos heterólogos más fáciles de manipular y
multiplicar. Dentro de las diferentes opciones que se pueden
estudiar, cabe destacar aquéllas que no sólo pretenden la
35 expresión de un gen o conjunto de genes sino que, además, tratan
de facilitar la obtención de un producto de interés
biotecnológico y de alto valor añadido, como son los
bioplásticos. Sin embargo, el uso de este tipo de biopolímeros

no se ha implantado hasta ahora en el mercado de forma competitiva debido al bajo coste que aún mantiene la síntesis de los polímeros plásticos derivados del petróleo (Prieto et al. 2007. Synthesis and degradation of polyhydroxyalkanoates. In *Pseudomonas: a Model System in Biology*. *Pseudomonas*, vol. V, Eds, Ramos, J. L. y Filloux, A. Springer, 397-428).

Actualmente, como consecuencia del problema de contaminación medioambiental que ha generado el uso del plástico convencional y el incremento del precio del petróleo, se está haciendo una apuesta clara por la implantación de procesos de tipo sostenible para la obtención de energía y la producción de materiales de alto consumo como son los polímeros plásticos.

Los polihidroxiálcanoatos, conocidos comúnmente como "bioplásticos", son polímeros biodegradables producidos por ciertas bacterias, que se acumulan en el interior celular en forma de gránulos de reserva de fuente de carbono cuando las condiciones de cultivo no son óptimas para el crecimiento (Prieto et al. 2007. Synthesis and degradation of polyhydroxyalkanoates. In *Pseudomonas: a Model System in Biology*. *Pseudomonas*, vol. V, Eds, Ramos, J. L. y Filloux, A. Springer, 397-428).

Estos biopolímeros biodegradables son sintetizados por bacterias a partir de fuentes renovables como la glucosa, la fructosa o los ácidos grasos que forman parte de los aceites vegetales (Prieto et al. 2007. Synthesis and degradation of polyhydroxyalkanoates. In *Pseudomonas: a Model System in Biology*. *Pseudomonas*, vol. V, Eds, Ramos, J. L. y Filloux, A. Springer. 397-428). Por tanto, se puede definir el término bioplástico como biopolímero sintetizado a partir de fuentes renovables, que puede ser degradado en condiciones controladas de biodegradación y que presenta características físico-químicas similares a los plásticos derivados de la industria petroquímica (Sarasa et al. 2009. *Bioresour. Technol.* 100: 3764-3768).

En general, los gránulos de PHA están compuestos por un poliéster que comprende 93-97% del peso seco del gránulo (PSG), rodeado por entre 1-6 % del PSG de fosfolípidos y entre 1-2 % del PSG de proteínas asociadas al gránulo (denominadas GAPs según sus siglas en inglés), las cuales forman una fina capa en la superficie del gránulo (Steinbüchel et al. 1995. *Can. J. Microbiol.* 41: 94-105).

Los PHAs se clasifican en dos tipos principales de acuerdo a su estructura química: los PHAs de cadena corta (scl-PHAs) obtenidos a partir de monómeros con 4 o 5 átomos de carbono y los de cadena media (mcl-PHAs) procedentes de monómeros con 6 a 14 átomos de carbono. Los diferentes PHAs identificados hasta la fecha son polímeros lineales compuestos de 3-hidroxiácidos grasos exclusivamente de la configuración *R*. El peso molecular de estos polímeros puede variar entre 50.000-1.000.000 y su diversidad radica en las sustituciones en el carbono asimétrico en posición 3, que le confiere al polímero el carácter quiral. Estos polímeros, biopoliésteres, están formados únicamente por la forma enantiomérica *R* de los hidroxialcanoatos (RHA) (Prieto et al. 1999. *J. Bacteriol.* 181: 858-868; Chen et al. 2005. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67:592-599; Ren et al. 2010. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87:41-52).

El scl-PHA más abundante en bacterias y más estudiado hasta la fecha es el poli-(3-hidroxibutirato) (PHB), cuya ruta específica de síntesis ha sido ampliamente investigada en la cepa bacteriana *Ralstonia eutropha* H16, recientemente reclasificada como *Cupriavidus necator* H16 (Poehlein et al. 2011. *J. Bacteriol.* 193: 5017). Este polímero se sintetiza a partir de acetil-CoA en una serie de tres reacciones consecutivas. En primer lugar se acoplan dos moléculas de acetil-CoA, generando acetoacetil-CoA en una reacción de condensación catalizada por una β -cetoacil-CoA tiolasa (PhbA). A continuación, el acetoacetil-CoA generado es reducido estereoselectivamente dando (*R*)-3-hidroxibutiril-CoA en una reacción catalizada por la acetoacetil-CoA reductasa dependiente de NADPH (PhbB). Finalmente, los monómeros de (*R*)-3-hidroxibutiril-CoA son

polimerizados por la acción de una polimerasa de PHB (PhbC) (Peoples y Sinskey, 1989. *J. Biol. Chem.* 264: 15298-15303).

Los mcl-PHA producidos por el género *Pseudomonas* están
5 compuestos mayoritariamente por monómeros de ácido hidroxioctanoico, pero también se pueden encontrar en menor porcentaje una gran diversidad de monómeros que contienen como sustituyentes grupos aromáticos, alifáticos, insaturados, saturados, con ramificaciones, etc. (García et al. 1999. *J.*
10 *Biol. Chem.* 274: 29228-29241). Esto es debido principalmente a la gran diversidad metabólica que caracteriza a estos microorganismos ya que pueden transformar una gran variedad de sustratos en intermediarios 3-hidroxialcanoicos mediante la ruta de β -oxidación y de síntesis de novo de ácidos grasos (Prieto et
15 al. 2007. Synthesis and degradation of polyhydroxyalkanoates. In *Pseudomonas: a Model System in Biology*. *Pseudomonas*, vol. V, Eds, Ramos, J. L. y Filloux, A. Springer. 397-428).

Se sabe que la composición del PHA depende de la fuente de
20 carbono presente en el medio de cultivo utilizado durante la fermentación de la bacteria productora (Durner et al. 2001. *Biotechnol. Bioeng.* 72: 278-288; Jung et al. 2001. *Biotechnol. Bioeng.* 72:19-24). Por otra parte, es importante resaltar que las características físico-químicas de estos polímeros varían
25 según la naturaleza química de los monómeros que los componen (Madison y Huisman, 1999. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63: 21-53). Teniendo en cuenta que se han descrito más de 140 RHAs diferentes en PHAs producidos por bacterias (Steinbüchel et al. 1995. *Can. J. Microbiol.* 41: 94-105), y que el biopolímero
30 después de su obtención por fermentación puede ser sometido a posteriores modificaciones químicas, como a su entrecruzamiento y a la adición de grupos funcionales (Hazer et al., 2007. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74: 1-12), es fácil imaginar la gran diversidad de PHAs y RHAs diferentes que pueden generarse
35 mediante la combinación de todos estos procesos. Es importante señalar que los PHAs también pueden ser útiles para aplicaciones biomédicas como biomateriales (Zinn et al. 2001. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 53: 5-21). Además, el PHA puede ser considerado como

una fuente de RHAs, nuevos compuestos quirales (sintones) de gran utilidad como precursores en la industria farmacéutica, ya que son difíciles de conseguir en estado puro mediante procesos químicos convencionales.

5

Dentro de los costes de producción de los polihidroxialcanoatos (PHA), el proceso de extracción es probablemente el paso más importante a la hora de reducir costes y resolver el proceso de forma respetuosa con el medio ambiente. Hasta ahora se han desarrollado diferentes métodos para extraer PHA, pero en su mayoría requieren el uso de disolventes orgánicos que son poco respetuosos con el medio ambiente, o cócteles enzimáticos o detergentes, que siendo más respetuosos con el medio ambiente tienen algunos inconvenientes a la hora de escalar el proceso a nivel industrial (Jacquel *et al.* 2008. *Biochem. Eng. J.* 39: 15-27; Elbahloul y Steinbüchel, 2009. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 643-651; Kunasundari y Sudesh, 2011. *Express Polymer Letters* 5: 620-634). Más recientemente se han propuesto métodos de lisis para la extracción del PHA basados en el uso de bacterias modificadas genéticamente que tienen alteradas las propiedades de la superficie celular y que por lo tanto se lisan más fácilmente (Martínez *et al.* 2011. *Microb. Biotechnol.* 4: 533-547; "Sistema de autólisis celular para el procesado de la biomasa bacteriana en la producción de polihidroxialcanoatos en *Pseudomonas putida* KT2440"; solicitud de patente PCT/ES2010/070858 Martínez *et al.* publicada como WO 2011/086211 A1). Sin embargo, este método tiene el inconveniente de que al utilizar células parcialmente debilitadas en sus estructuras celulares su manipulación es más delicada y el proceso industrial es más complicado.

Por todo ello, el desarrollo de nuevos métodos o procesos para la producción y extracción de PHAs de forma competitiva y ecológica, se ha convertido en un objetivo fundamental dentro de la biotecnología medioambiental.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Breve descripción de la invención

La presente invención proporciona un procedimiento mediante el cual se puede extraer, de forma competitiva y ecológica, un bioproducto seleccionado del grupo que consiste en polihidroxialcanoato (PHA), hidrolizado de PHA y una cualquiera de sus mezclas, a partir de bacterias productoras presa cultivadas en un medio de producción del bioproducto. La extracción del bioproducto se consigue mediante la acción de una bacteria depredadora que provoca una lisis controlada de la bacteria productora y la liberación del bioproducto al medio extracelular. Preferiblemente, la bacteria productora presa es una bacteria Gram-negativa.

La depredación es un tipo de interacción biológica en la que un individuo (el depredador) se alimenta de otro (la presa) para subsistir. Se trata de un tipo de relación interespecífica, es decir, que se da entre organismos de distintas especies, muy común en la naturaleza, incluyendo también el mundo microbiano. Dentro de este último, la depredación bacteriana es un modo de interacción según el cual un organismo depredador ataca y consume a una bacteria presa.

Las bacterias depredadoras de otras bacterias poseen una amplia distribución en la naturaleza, tanto en hábitats terrestres como acuáticos, incluyendo ambientes extremos o anaerobios. Este tipo de bacterias muestran diferentes fenotipos y adaptaciones metabólicas, pudiendo ser depredadores obligados si son incapaces de replicar en ausencia de presa, o facultativos si no son dependientes de la presencia de una presa. Además, estas bacterias depredadoras utilizan diversas estrategias de depredación. Entre éstas se encuentra la depredación periplásmica, en la que los depredadores invaden el espacio periplásmico de la presa, donde se establecen y degradan el contenido intracelular mientras crecen y se dividen. Esta estrategia de invasión periplásmica es característica del grupo de depredadores obligados denominado *Bdellovibrio* y organismos similares denominados en general como BALOs (del inglés *Bdellovibrio and like organisms*),

que constituye el grupo de bacterias predadoras mejor estudiado hasta la fecha (Jurkevitch y Davidov, 2007. Phylogenetic diversity and evolution of predatory prokaryotes. In *Jurkevitch, E. (ed.), Predatory Prokaryotes*, vol. IV. Springer-Verlag. 11-56).

Los resultados obtenidos por los investigadores y que sirven de base para esta solicitud de patente son sorprendentes ya que un experto en la materia no esperaría que una bacteria predadora fuera capaz de preda bacterias presa conteniendo en su citoplasma gránulos de bioproducto, es decir, gránulos de PHA, hidrolizado de PHA o una mezcla de ambos.

Adicionalmente, la presente invención también proporciona un método de obtención de un bioproducto seleccionado del grupo que consiste en PHA, hidrolizado de PHA y una cualquiera de sus mezclas, caracterizado porque comprende:

- a) cultivar la bacteria productora presa en un medio de cultivo en el que se produce el bioproducto,
- b) extraer el bioproducto obtenido en la etapa a) mediante el procedimiento de extracción descrito en el primer aspecto de esta invención, y
- c) aislar el bioproducto.

Durante la etapa a) de fermentación, el bioproducto se acumula en el interior de la bacteria productora en forma de gránulos de PHA. Posteriormente, en la etapa b) estos gránulos son liberados al medio extracelular al lisar la bacteria predadora la pared celular de la bacteria productora presa. En la etapa c) se aísla el bioproducto de los gránulos extraídos. Esta etapa de aislamiento puede comprender uno o más procedimientos de purificación. Adicionalmente, si el bioproducto obtenido en la etapa a) es una mezcla, esta etapa de aislamiento también puede comprender la separación de los diferentes componentes de dicha mezcla.

Adicionalmente, el bioproducto seleccionado del grupo que consiste en polihidroxialcanoato (PHA), hidrolizado de PHA y una

cualquiera de sus mezclas obtenido por el método tal como se describe en esta solicitud de patente, puede modificarse químicamente para obtener un derivado de PHA diferente. Esta modificación química puede comprender una o más etapas seleccionadas del grupo que consiste en entrecruzamiento, hidrólisis o adición de uno o más grupos funcionales. Estas etapas adicionales pueden realizarse siguiendo metodologías conocidas por el experto en la materia, por ejemplo, tal como se describen Hazer *et al.*, 2007. Appl. Microbiol. Biotechnol. 74: 1-12.

Los resultados obtenidos por los investigadores y que sirven de base para esta solicitud de patente son sorprendentes ya que un experto en la materia esperaría que la bacteria depredadora, de ser capaz de depredar la bacteria productora presa, consumiera los bioproductos acumulados en el interior de dicha bacteria y, en consecuencia, el rendimiento del método de obtención de PHA, un hidrolizado de PHA o una mezcla de estos sería muy bajo.

20 Descripción detallada de la invención

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento de extracción de un bioproducto seleccionado del grupo que consiste en polihidroxialcanoato (PHA), hidrolizado de PHA y una cualquiera de sus mezclas, y obtenido por fermentación de una bacteria productora presa, caracterizado dicho procedimiento de extracción porque comprende mezclar la bacteria productora presa que contiene el bioproducto en su interior con una bacteria depredadora en un medio que comprende una fuente de Ca y Mg. Preferiblemente, en un medio que comprende CaCl_2 y MgCl_2 .

De esta manera, la bacteria depredadora origina la ruptura de la envoltura celular de la bacteria productora presa, dando lugar a la liberación de los gránulos del bioproducto acumulados en el citoplasma celular. Así, la presente invención proporciona una solución a la extracción de compuestos producidos por bacterias, en particular a la extracción de un bioproducto seleccionado del

grupo que consiste en PHA, hidrolizado de PHA y una cualquiera de sus mezclas, disminuyendo con ello el uso de productos químicos contaminantes utilizados para lisar las células productoras.

5

En esta solicitud de patente, se entiende por "hidrolizado de PHA" monómero, dímero, oligómero o mezcla de los anteriores. Este hidrolizado de PHA, también llamado RHA, puede obtenerse por acción de enzimas depolimerasa presentes en las bacterias
10 predadoras y/o en las propias bacterias productoras presa.

La "bacteria productora presa" a la que se hace referencia en esta solicitud de patente es una bacteria productora de uno o varios compuestos de interés, preferiblemente productora de un
15 bioproducto seleccionado del grupo que consiste en PHA, hidrolizado de PHA y una cualquiera de sus mezclas, que puede ser lisada por la bacteria predadora utilizada en el procedimiento de extracción de la invención.

20 La "bacteria predadora" tal como se emplea en la presente invención se refiere a una bacteria capaz de lisar células bacterianas productoras de uno o varios compuestos de interés, preferiblemente productora de un bioproducto seleccionado del grupo que consiste en polihidroxialcanoato (PHA), hidrolizado de
25 PHA y una cualquiera de sus mezclas.

En una realización preferida, la presente invención se refiere al procedimiento de extracción tal como se describe en esta solicitud de patente, donde la bacteria predadora es capaz de
30 lisar bacterias presa Gram-negativas. Más preferiblemente, la bacteria predadora del procedimiento de extracción de la presente invención pertenece al grupo de los BALOs (del inglés *Bdellovibrio and like organisms*). Hasta la fecha se han definido las siguientes especies de BALOs: *Micavibrio* spp (alfa proteobacteria), *Bdellovibrio* spp., *Bacteriovorax* spp. y
35 *Peridibacter* spp. (delta proteobacterias) (Jurkevitch, 2007. *Microbe*, 2: 67-73).

El grupo de los BALOs está formado por bacilos curvados Gram-negativos de pequeño tamaño, aeróbicos y altamente móviles, predadores obligados de otras bacterias Gram-negativas. Hasta la fecha, las presas empleadas para aislar y caracterizar

5 *Bdellovibrio* pertenecen exclusivamente al filo Proteobacteria, siendo principalmente *Escherichia coli*, *Pseudomonas* spp., y *Erwinia* spp. para hábitats terrestres y de agua dulce, y *Vibrio parahaemolyticus* para hábitats marinos (Jurkevitch y Davidov, 2007. Phylogenetic diversity and evolution of predatory

10 prokaryotes. In Jurkevitch, E. (ed.), *Predatory Prokaryotes*, vol. IV. Springer-Verlag. 11-56). Dependiendo de la cepa empleada como presa, la eficiencia de la depredación es diferente; de hecho, se ha determinado que en poblaciones de presas heterogéneas, *Bdellovibrio* infecta unas presas más

15 eficientemente que otras (Rogosky et al. 2006. *Curr. Microbiol.* 52: 81-85).

La mayoría de los BALOs pertenecen a la clase de las delta proteobacterias, dentro del orden *Bdellovibrionales*, el cual

20 comprende dos familias diferentes: *Bdellovibrionaceae* y *Bacteriovoracaceae* (Davidov y Jurkevitch, 2004. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 1439-1452). Una excepción es un miembro del grupo de los BALOs denominado *Micavibrio* spp., que ha sido clasificado como alfa proteobacteria (Davidov et al. 2006.

25 *Environ. Microbiol.* 8: 2179-2188).

Se conoce el rango de presas de distintos *Bdellovibrios* aislados de suelo y rizosfera, y de la cepa *B. bacteriovorus* 109J (Jurkevitch et al. 2000. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2365-

30 2371).

En una realización aún más preferida, la presente invención se refiere al procedimiento de extracción de un bioproducto seleccionado del grupo que consiste en PHA, hidrolizado de PHA y

35 una cualquiera de sus mezclas, y obtenido por fermentación de una bacteria productora presa, donde dicho procedimiento de extracción comprende mezclar la bacteria productora presa que contiene el bioproducto en su interior con *Bdellovibrio*

bacteriovorus HD100 en un medio que comprende una fuente de Ca y Mg.

La clasificación científica de esta bacteria predadora es:

5 Reino: *Bacteria* / División: *Proteobacteria* / Orden:
Bdellovibrionales / Familia: *Bdellovibrionaceae* / Género:
Bdellovibrio / Especie: *bacteriovorus*.

La bacteria *Bdellovibrio bacteriovorus* HD100 es un predador
10 pequeño que se encuentra en el suelo, que pertenece a las delta
proteobacterias y que se alimenta de una amplia gama de otras
bacterias Gram-negativas, incluyendo los patógenos humanos
(Sokkett, 2009. *Annu. Rev. Microbiol.* 63: 523-539). El ciclo de
vida de *B. bacteriovorus* es único en el sentido que es bifásico,
15 alternando una fase libre no replicativa de ataque y una fase
dependiente de presa con crecimiento intraperiplásmico (Stolp y
Starr, 1963. *Antonie Van Leeuwenhoek* 29: 217-248). Durante la
fase de crecimiento en el interior del periplasma de la célula
hospedadora, *Bdellovibrio* replica su ADN y crece con la presa
20 como fuente de nutrientes, formando el bdelloplasto, célula de
la presa redondeada debido a las modificaciones de la pared
celular y que contiene el predador. Cuando los recursos
energéticos de la presa se agotan, el *Bdellovibrio* se divide y
la progenie se libera para invadir presas frescas lisando la
25 presa (Lambert et al. 2006. *Curr. Opin. Microbiol.* 9: 639-644;
Sokkett, 2009. *Annu. Rev. Microbiol.* 63: 523-539).

El análisis genómico de *B. bacteriovorus* HD100 ha revelado el
complejo repertorio de enzimas hidrolíticas de esta bacteria
30 (Rendulic et al. 2004. *Science* 303: 689-692). *Bdellovibrio*
constituye, por tanto, un amplio reservorio de enzimas
diferentes y de interés industrial por sus potenciales
aplicaciones biotecnológicas (Jurkevitch y Davidov, 2007.
Phylogenetic diversity and evolution of predatory prokaryotes.
35 In Jurkevitch, E. (ed.), *Predatory Prokaryotes*, vol. IV.
Springer-Verlag. 11-56), entre las que cabe destacar las
despolimerasas de PHAs, que hidrolizan el polímero dando lugar a

sus derivados RHAs (Martinez, V., et al., 2012. *Appl. Environ. Microbiol.* 78: 6017-6026).

En otra realización preferida, la bacteria productora presa en el procedimiento de extracción del bioproducto seleccionado del grupo que consiste en PHA, hidrolizado de PHA y una cualquiera de sus mezclas, y obtenido por fermentación tal como se describe en esta solicitud de patente, es una bacteria Gram-negativa.

En una realización más preferida, la bacteria productora presa que da lugar a la obtención del bioproducto seleccionado del grupo que consiste en PHA, hidrolizado de PHA y una cualquiera de sus mezclas tal como se describe en esta invención, es una bacteria Gram-negativa susceptible de ser predada por BALOs, perteneciente exclusivamente al reino de las *Proteobacteria*, siendo principalmente del género *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Cupriavidus*, *Erwinia*, *Vibrio*, *Alcaligenes*, *Ralstonia*, *Rhodospirillum* o *Wautersia*.

Preferiblemente, esta bacteria Gram-negativa se selecciona del grupo que consiste en *Pseudomonas putida* KT2440 y *Cupriavidus necator* H16.

La clasificación científica de una de las bacterias presa especialmente preferidas de la presente invención es: Reino: *Bacteria* / División: *Proteobacteria* / Orden: *Pseudomonadales* / Familia: *Pseudomonadaceae* / Género: *Pseudomonas* / Especie: *putida*.

La clasificación científica de otra de las bacterias presa especialmente preferidas de la presente invención es: Reino: *Bacteria* / División: *Proteobacteria* / Orden: *Burkholderiales* / Familia: *Burkholderiaceae* / Género: *Cupriavidus* / Especie: *necator*.

35

En una realización aún más preferida, la presente invención proporciona un procedimiento de extracción de un bioproducto seleccionado del grupo que consiste en PHA, hidrolizado de PHA y

una cualquiera de sus mezclas, y obtenido por fermentación de una bacteria productora presa, donde dicho procedimiento de extracción comprende mezclar la bacteria productora presa que contiene el bioproducto en su interior seleccionada del grupo
5 que consiste en *Pseudomonas putida* KT2440 y *Cupriavidus necator* H16, con *Bdellovibrio bacteriovorus* HD100 en un medio que comprende una fuente de Ca y Mg.

En otra realización preferida, la presente invención se refiere
10 al procedimiento de extracción de un bioproducto seleccionado del grupo que consiste en PHA, hidrolizado de PHA y una cualquiera de sus mezclas, obtenido por fermentación de una bacteria productora presa tal como se describe en esta solicitud de patente, que comprende la adición de la bacteria predadora a
15 un medio de cultivo que comprende una fuente de Ca y Mg donde se encuentra la bacteria productora presa que contiene el bioproducto en su interior. Preferiblemente, la bacteria predadora pertenece al grupo de los BALOs y la bacteria productora presa es Gram-negativa. Más preferiblemente, la
20 bacteria predadora es *Bdellovibrio bacteriovorus* HD100 y la bacteria productora presa se selecciona del grupo que consiste en *Pseudomonas putida* KT2440 y *Cupriavidus necator* H16.

En una realización más preferida, el medio de cultivo que
25 comprende una fuente de Ca y Mg donde se encuentra la bacteria productora presa que contiene el bioproducto en su interior es un tampón fisiológico que comprende una fuente de Ca y Mg, preferiblemente es HEPES al que se ha adicionado CaCl_2 y MgCl_2 .

30 Adicionalmente, la presente invención también se refiere al uso de una bacteria predadora para extraer al menos un compuesto sintetizado por una bacteria presa. Este aspecto adicional de la presente invención se basa en la capacidad de la bacteria predadora para producir la lisis de las células productoras con
35 capacidad de ser predadas, dando lugar a la liberación en el medio extracelular del compuesto sintetizado por las células. En realizaciones preferidas de este aspecto adicional de la presente invención, la bacteria presa y la bacteria predadora se

definen tal como se indica en el primer aspecto de esta invención.

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un método de obtención de un bioproducto seleccionado del grupo que
5 consiste en polihidroxialcanoato (PHA), hidrolizado de PHA y una cualquiera de sus mezclas por fermentación de una bacteria productora presa, caracterizado dicho método de obtención porque comprende:

- 10 a) cultivar la bacteria productora presa en un medio de cultivo para producir el bioproducto,
- b) extraer el bioproducto obtenido en la etapa a) mediante el procedimiento de extracción descrito en el primer aspecto de esta invención, y
- 15 c) aislar el bioproducto.

La etapa c) de aislamiento del bioproducto tal como se describe en esta solicitud de patente puede realizarse mediante una o más técnicas que forman parte del conocimiento general común y, por
20 tanto, están disponibles a un experto en la materia. El aislamiento del bioproducto se puede llevar a cabo por ejemplo, pero sin limitarse, mediante precipitación de dicho producto con fraccionamiento salino, precipitación por calor, precipitación isoeléctrica, con disolventes orgánicos o con polímeros, con
25 acetona fría o mediante cromatografía.

Adicionalmente, el método de obtención del bioproducto tal como se describe en esta solicitud de patente puede comprender una o más etapas de purificación. De ser así, estas pueden tener lugar
30 mediante procedimientos convencionales ampliamente conocidos por el experto en la materia.

Si el bioproducto obtenido en la etapa a) es una mezcla de PHA e hidrolizado de PHA, la etapa c) puede comprender la separación de
35 dicha mezcla para obtener un bioproducto que es uno de los componentes de la mezcla obtenida inicialmente. Estos procedimientos de separación también pueden tener lugar por

técnicas que forman parte del conocimiento general común, por ejemplo, por centrifugación.

En una realización preferida, la etapa a) del método de
5 obtención del bioproducto seleccionado del grupo que consiste en PHA, hidrolizado de PHA y una cualquiera de sus mezclas tal como se describe en esta solicitud de patente, puede comprender cultivar la bacteria productora presa, preferiblemente *Pseudomonas putida* KT2440 o *Cupriavidus necator* H16, en un medio
10 de cultivo que comprende como fuente de carbono cualquier compuesto susceptible de ser transformado en hidroxialcanoil-CoA mediante el metabolismo bacteriano. Preferiblemente, la fuente de carbono se selecciona del grupo que consiste en glucosa, fructosa y ácido graso procedente de aceite esencial.

15 En otra realización preferida, la presente invención se refiere a un método de obtención de un bioproducto seleccionado del grupo que consiste en PHA, hidrolizado de PHA y una cualquiera de sus mezclas, donde la etapa a) tiene lugar en un medio mínimo
20 de cultivo.

El término "medio mínimo" tal como se emplea en la presente invención se refiere a un medio de cultivo que comprende sales minerales de fósforo, azufre, hierro, magnesio, potasio y
25 nitrógeno, y un compuesto que las bacterias presa puedan utilizar como fuente de carbono.

En una realización más preferida, el medio mínimo de cultivo de la etapa a) tal como se describe en esta solicitud de patente
30 comprende KH_2PO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y SO_4Fe , siendo especialmente preferible que el medio mínimo de cultivo comprenda 13.6 g KH_2PO_4 ; 0.2 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0.5 mg $\text{SO}_4\text{Fe} \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ por litro, tamponado a pH 7, medio de cultivo denominado 0.1 N M63, suplementado con 1 mM de MgSO_4 y una solución de elementos traza (Moldes et al.,
35 2004. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70: 3205-3212).

En una realización aún más preferida, la presente invención se refiere al método de obtención tal como se describe en esta

solicitud de patente, donde la etapa a) comprende cultivar *Pseudomonas putida* KT2440 en un medio mínimo de cultivo, preferiblemente el medio denominado 0,1 N M63 suplementado con ácido octanoico como única fuente de carbono, para producir una
5 mezcla de PHA e hidrolizado de PHA.

En una realización especialmente preferida, la presente invención se refiere a un método de obtención de PHA por fermentación de una bacteria productora presa, donde dicho
10 método comprende:

- a) cultivar *Pseudomonas putida* KT2440 en un medio mínimo de cultivo, preferiblemente el medio denominado 0,1 N M63 suplementado con ácido octanoico como única fuente de carbono, para producir una mezcla de PHA e hidrolizado de
15 PHA,
- b) extraer la mezcla obtenida en la etapa a) mediante el procedimiento de extracción descrito en el primer aspecto de esta invención, preferiblemente añadiendo *Bdellovibrio bacteriovorus* HD100 a una suspensión de células de
20 *Pseudomonas putida* KT2440 cultivadas en la etapa a) en HEPES al que se ha adicionado CaCl_2 y MgCl_2 , y
- c) aislar PHA.

Esta realización preferida la etapa c) comprende el aislamiento
25 de PHA de los gránulos y la separación de la mezcla que comprende PHA e hidrolizado de PHA obtenida en las etapas previas del método de la presente invención. Esta etapa c) puede comprender un procedimiento de centrifugación. Preferiblemente, esta etapa c) de aislamiento comprende: centrifugar el co-
30 cultivo que comprende *Pseudomonas putida* KT2440 lisada y la bacteria predadora obtenido tras la etapa b), separar el sedimento que comprende mayoritariamente PHA y purificar dicho sedimento por disolución y precipitación en disolventes adecuados. Aún más preferiblemente, en la purificación se
35 utiliza acetato de etilo para disolver el sedimento y metanol para precipitar PHA purificado.

En otra realización especialmente preferida, la presente invención se refiere a un método de obtención de hidrolizado de PHA por fermentación de una bacteria productora presa, donde dicho método comprende:

- 5 a) cultivar *Pseudomonas putida* KT2440 en un medio mínimo de cultivo, preferiblemente el medio denominado 0,1 N M63 suplementado con ácido octanoico como única fuente de carbono, para producir una mezcla de PHA e hidrolizado de PHA,
- b) extraer la mezcla obtenida en la etapa a) mediante el
10 procedimiento de extracción descrito en el primer aspecto de esta invención, preferiblemente añadiendo *Bdellovibrio bacteriovorus* HD100 a una suspensión de células de *Pseudomonas putida* KT2440 cultivadas en la etapa a) en HEPES al que se ha adicionado CaCl_2 y MgCl_2 , y
- 15 c) aislar el hidrolizado de PHA.

Esta etapa c) de aislamiento comprende la separación y purificación del hidrolizado de PHA extraído en la etapa b). En la literatura se han descrito ampliamente procedimientos de
20 separación y purificación de hidrolizados de PHA. Lo más habitual es separarlos mediante métodos cromatográficos, como por ejemplo HPLC con columnas C18 de fase reversa. (Ruth et al., 2007. *Biomacromolecules*, 8: 279-286).

25 En otra realización preferida, la presente invención se refiere a un método de obtención de un bioproducto seleccionado del grupo que consiste en PHA, hidrolizado de PHA y una cualquiera de sus mezclas tal como se describe en esta solicitud de patente, donde la etapa a) tiene lugar en un medio rico de
30 cultivo.

El término "medio rico" tal como se emplea en la presente invención se refiere a un medio que contiene sustancias de composición compleja y poco definida que puedan servir como
35 fuente de nutrientes y energía para el crecimiento del microorganismo.

En una realización más preferida, el medio rico de cultivo de la etapa a) del método de obtención del bioproducto tal como se describe en esta solicitud de patente está constituido por un medio nutritivo, conocido como medio nutritivo (NB, Nutrient Broth) (Difco) compuesto de 3 g/l de extracto de carne y 5 g/l de peptona, o el medio Lysogeny Broth (LB) (Sambrook y Russell, 2001. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. CSHL Press, Cold Spring Harbor, Nueva York).

- 10 En una realización aún más preferida, la presente invención se refiere al método de obtención de un bioproducto seleccionado del grupo que consiste en PHA, hidrolizado de PHA y una cualquiera de sus mezclas, por fermentación de *Cupriavidus necator*, caracterizado dicho método porque comprende:
- 15 a) cultivar *Cupriavidus necator* en un medio rico de cultivo (NB) suplementado con gluconato sódico para producir el bioproducto,
b) extraer el bioproducto obtenido en la etapa a) mediante el procedimiento de extracción descrito en el primer aspecto de la presente invención, preferiblemente añadiendo *Bdellovibrio bacteriovorus* HD100 a una suspensión de células de *Cupriavidus necator* cultivadas en la etapa a) en HEPES al que se ha
20 adicionado CaCl_2 y MgCl_2 , y
c) aislar el bioproducto.

- 25 En una realización especialmente preferida, la etapa c) comprende el aislamiento de PHA o de hidrolizado de PHA. Tal como se ha mencionado anteriormente, esta etapa de aislamiento puede comprender una o más etapas y pueden utilizarse técnicas ampliamente conocidos por el experto en la materia.

30

En otra realización especialmente preferida, el bioproducto aislado en la etapa c) es polihidroxibutirato (PHB).

- Adicionalmente, el bioproducto seleccionado del grupo que
35 consiste en polihidroxialcanoato (PHA), hidrolizado de PHA y una cualquiera de sus mezclas obtenido por el método tal como se describe en esta solicitud de patente, puede modificarse químicamente para obtener un derivado de PHA diferente. Esta

modificación química puede ser hidrólisis de PHA para obtener RHA, entrecruzamiento o funcionalización de PHA para obtener un biopolímero con propiedades diferentes al PHA obtenido por fermentación como las detalladas en Hazer et al., 2007. Appl. Microbiol. Biotechnol. 74: 1-12: copolimerización o funcionalización de cadena lateral basadas en esterificación, entrecruzamiento, cloración, epoxidación etc.

El PHA obtenido por el método tal como se describe en esta solicitud de patente, se puede utilizar en la fabricación de un material de envasado tal como, por ejemplo, una película. Dicho material de envasado puede utilizarse, entre otras, en la industria alimentaria o farmacéutica.

Adicionalmente, el PHA obtenido por el método de obtención tal como se describe en esta solicitud de patente también se puede hidrolizar para obtener 3-hidroxiácido (RHA), compuesto que puede utilizarse como precursor en la síntesis de productos farmacéuticos. Los monómeros y oligómeros de PHA son importantes componentes con considerables aplicaciones biotecnológicas. Se ha demostrado que algunos RHAs son compuestos con actividad antimicrobiana, insecticida, antiviral, e incluso se han descrito RHAs como agentes antitumorales como la *hapalosina* y el *ONO-4007* (de Roo et al., 2002. *Biotechnol. Bioeng.*, 77: 717-722). Los RHAs son sintones para la fabricación de vitaminas, aromatizantes, antibióticos y feromonas. Así, por ejemplo, el (*R*)-3-hidroxibutirato se utiliza para la síntesis de *Tienamicina* y *Captopril* (Ohashi y Hasegawa, 1992. In: Sheldrake G. N., A. N. Collins, J. Crosby, editors. *Chirality in industry*. New York: John Wiley & Sons. 1992, p. 269-278) y el (*R*)-4-ciano-3-hidroxibutirato es un intermediario muy importante en la fabricación del *Lipitor*, uno de los medicamentos de elección para el control de los niveles de colesterol (Roth, 2002. *Prog. Med. Chem.*, 40: 1-22). Ejemplos de otros compuestos sintetizables a partir de RHAs son el precursor de L-659,699 que es un inhibidor de la síntesis de colesterol, depsipeptidos con actividad antimicrobiana o fungicida, (-)-tetrahidrolipstatina, una droga para el tratamiento de la

obesidad, inmunosupresores como las estevastelins B y B3, el antibiótico globomicina, y pravastatina, para el tratamiento de la hipercolesterolemia (revisado en Ren et al. 2010. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87:41-52).

5

EJEMPLOS

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos ilustrativos y de carácter no limitante, realizados por los inventores que describen el uso de las cepas de la invención para la extracción de cualquier compuesto sintetizado por la cepa de *Pseudomonas putida* KT2442, y *Cupriavidus necator* H16.

EJEMPLO 1. Materiales y métodos

15

1.1. Descripción de los microorganismos empleados.

Las cepas utilizadas se detallan en la Tabla 1.

20 **Tabla 1.** Cepas empleadas.

Cepa	Genotipo/fenotipo relevante	Referencia
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	<i>Pseudomonas putida</i> mt-2 curada del plásmido TOL, <i>hsdR</i>	ATCC47054
<i>Bdellovibrio bacteriovorus</i> HD100	Cepa tipo, genoma secuenciado	ATCC15356
<i>Cupriavidus necator</i> H16	PHB+	ATCC17699

1.2. Medios y condiciones de cultivo empleados.

El medio rico utilizado para cultivar las células fue el medio nutritivo (NB, Nutrient Broth) (Difco) o el medio Lysogeny Broth (LB) (Sambrook y Russell, 2001. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. CSHL Press, Cold Spring Harbor, Nueva York).

El medio mínimo utilizado para cultivar las células fue el medio denominado 0,1 N M63 (13,6 g KH₂PO₄; 0,2 g (NH₄)₂SO₄; 0,5 mg FeSO₄

30

× 7 H₂O por litro, pH 7) suplementado con 1 mM de MgSO₄ y una solución de elementos traza (Moldes *et al.*, 2004. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70: 3205-3212).

- 5 Los cultivos en medio líquido se realizaron en matraces en un agitador orbital (New brunswick scientific) con agitación (200-250 rpm) y 30°C.

10 La bacteria *Bdellovibrio bacteriovorus* HD100 fue rutinariamente crecida en co-cultivos en tampón HEPES (25 mM de HEPES modificado con 2 mM CaCl₂ • 2H₂O y 3 mM MgCl₂ • 3H₂O, pH 7,8) con *P. putida* KT2440 crecida en NB como presa durante 48 h a 30 °C y 250 rpm.

- 15 El crecimiento en medio líquido se determinó por turbidimetría a 600 nm (DO₆₀₀) empleando un espectrofotómetro Beckman DU-520.

Durante periodos inferiores a un mes las cepas se conservaron a 4°C en placas de LB. Para la conservación a largo plazo, las
20 bacterias se congelaron en el medio de cultivo correspondiente con glicerol al 15% (v/v) y se mantuvieron a -80°C.

Para producir PHA en *Pseudomonas putida* KT2440 se cultivaron las células durante 24 h en medio M63 0,1 N cuya composición es
25 similar a la del M63 pero con 0,2 g/l de (NH₄)₂SO₄ en lugar de 2 g/l, utilizando 15 mM de octanoato como única fuente de carbono (Moldes *et al.* 2004. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 3205-3212).

Para producir PHB en *Cupriavidus necator* H16 se cultivaron las
30 células durante 24 h a 30°C en medio NB suplementado con gluconato sódico 0,2% (Pfeiffer *et al.* 2011. *Molec. Microbiol.* 82: 936-951).

1.3. Cálculo de la viabilidad de los microorganismos.

35

Para calcular la viabilidad de la bacteria predadora se hicieron diluciones seriadas de los cultivos de 10⁻¹ a 10⁻⁷ en caldo nutritivo diluido que consiste en 0,8 g/l de NB suplementado con

2 mM CaCl_2 y 3 mM MgCl_2 . A continuación 0,1 ml de la dilución apropiada de células se mezcló con 0,5 ml de bacteria presa *P. putida* KT2440 preparada para ser predada. Para ello la bacteria presa se precultivó en NB, se centrifugo y se resuspendió el
5 sedimento celular en tampón HEPES a 10 de DO_{600} . Las mezclas de las distintas diluciones se agitaron y se sembraron en medio sólido DNB mediante el método de superposición de dos capas (Lambert *et al.* 2003. *Environ. Microbiol.* 5: 127-132). Los
10 predadores se cuentan como unidades formadoras de placas (ufp) en desarrollo en el césped de *P. putida* KT2440 después de 48 h de incubación a 30 ° C.

Para llevar a cabo este procedimiento se pueden utilizar en lugar de HEPES otro medio o tampón fisiológico como por ejemplo
15 medio NB diluido 10 veces (DNB).

Para calcular la viabilidad de las cepas presa, 10 μl de cada dilución del cultivo se plaqueó en medio LB sólido y se contaron las unidades formadoras de colonias (ufc).
20

1.4. Cálculo de biomasa.

Las densidades celulares, expresadas en gramos de peso de célula seca (CDW) por litro, se determinaron gravimétricamente
25 utilizando tubos Falcon tarados de 50 ml. Treinta mililitros de medio de cultivo se centrifugaron durante 45 min a 3800 x g y 4 °C. Los sedimentos celulares se liofilizaron durante 24 h en un liofilizador y se pesaron.

30 1.5. Crecimiento de *B. bacteriovorus* HD100 sobre cepas presa acumulando PHA.

30 ml de las cepas presa crecidas en medio de producción de PHA, se centrifugaron y se resuspendieron en 30 ml de tampón HEPES,
35 siendo la viabilidad de $3 \cdot 10^8$ ufc/ml. Posteriormente, se infectaron con $3 \cdot 10^7$ ufp/ml de *B. bacteriovorus* HD100. Los co-cultivos se desarrollaron en matraces de 250 ml en un volumen final de 30 ml con tampón HEPES.

1.6. Recuperación del PHA liberado al medio extracelular.

Con el objetivo de purificar el PHA liberado al medio de cultivo se centrifugaron 30 ml de co-cultivo de *B. bacteriovorus* HD100 predando sobre *P. putida* KT2440 durante 24 horas, y el sedimento resultante se resuspendió directamente en 1 ml del solvente orgánico etil-acetato. Después de la incubación con el solvente orgánico a temperatura ambiente y con agitación suave, se centrifugó y se precipitó el sobrenadante con 10 volúmenes de metanol. Tras la evaporación del alcohol, se cuantificó el contenido de PHA extraído.

1.7. Cuantificación de PHA.

Para cuantificar el PHA presente en los sedimentos celulares se tomaron de 5 a 10 mg de muestra liofilizada que se metanolizaron durante 4 h a 100°C en presencia de 2 ml de cloroformo y 2 ml de metanol: ácido sulfúrico (85:15, v:v) con 0,5 mg/ml de ácido metil benzoico como estándar interno. Tras enfriar los tubos, se añadió 1 ml de agua, se mezcló por agitación vigorosa (vórtex) y se separaron las fases centrifugando suavemente. La fase orgánica obtenida se analizó en un sistema cromatográfico compuesto por un cromatógrafo de gases Agilent (Waldbronn, Alemania) serie 7890 A acoplado a un detector de masas 5975. 1 µl de la fase orgánica fue inyectada en el cromatógrafo con un *split* 50:1. La separación de los compuestos se llevó a cabo en una columna capilar HP5 MS (5% fenil-95% metil siloxano, 30 m x 0,25 mm i.d. x 0,25 mm). Como gas portador se utilizó helio a un flujo de 0,9 ml/min. Las temperaturas del inyector y la línea de transferencia fueron de 275 y 300°C, respectivamente. El programa de temperatura de la columna fue el siguiente: temperatura inicial 80°C durante 2 min tras lo cual se aplicó una rampa de 10°C/min hasta alcanzar los 200°C. El espectro de masas se recogió en modo *full scan* (m/z 40-550). El análisis cuantitativo se llevó a cabo calculando los factores de respuesta de los monómeros con respecto al estándar interno 3-metilbenzoato. Para el cálculo de los factores se utilizaron

mezclas de concentraciones conocidas de PHA, obteniéndose para cada uno de los monómeros cuantificados un factor de respuesta cuyo coeficiente de variación no superó el 5%.

5 EJEMPLO 2. Producción de PHA en *Pseudomonas putida* KT2440.

Para estudiar la producción de PHA en la cepa de *Pseudomonas putida* KT2440 se cultivó la bacteria en una sola fase fermentativa en un medio mínimo según se describe en el Ejemplo 1.

El crecimiento en condiciones de producción de plástico en una sola fase fermentativa permite crecer a partir de una única fuente de carbono (ácido octanoico) y alcanzar un alto rendimiento biomasa/PHA.

Se comprobó la capacidad de *P. putida* KT2440 para crecer y producir PHA en un medio mínimo limitado en nitrógeno, con ácido octanoico como única fuente de carbono. La cepa es capaz de crecer y acumular PHA en esas condiciones fermentativas (Tabla 2). Este resultado fue confirmado mediante la cuantificación por GC-MS del contenido intracelular de PHA. Esto demostró que la cepa acumula PHA en las condiciones de crecimiento probadas (Tabla 2).

25

Tabla 2. Muestra el valor de densidad óptica (DO_{600} nm); el contenido intracelular de PHA; el recuento de células viables (ufc/ml) y la biomasa (g/l) correspondientes a células crecidas en una fase fermentativa a las 23 h de cultivo de la cepa *Pseudomonas putida* KT2440.

	<i>P. putida</i> KT2440
DO_{600}	7 ± 0.5
Contenido intracelular de PHA (g/l)	0.84 ± 0.1
Biomasa (g/l)	1.3 ± 0.11
Viabilidad (ufc/ml)	$3 \cdot 10^8$ ufc/ml

EJEMPLO 3. Lisis de *P. putida* KT2440 mediada por *B. bacteriovorus* HD100

5

El sistema lítico del presente ejemplo consiste en el crecimiento de *B. bacteriovorus* HD100 sobre *P. putida* KT2440 previamente crecida en las condiciones de producción de PHA descritas en el Ejemplo 2.

10

A lo largo de la incubación del co-cultivo se observa el crecimiento de la bacteria predadora provocando la lisis celular de la bacteria presa. A las 24 h de infección, la viabilidad de la presa disminuye 4 órdenes de magnitud (de $3 \cdot 10^8$ a $4 \cdot 10^4$ ufc/ml) mientras que la progenie de *B. bacteriovorus* HD100 aumenta más de dos órdenes de magnitud (de $3 \cdot 10^7$ a $1.5 \cdot 10^9$ ufp/ml) (Tabla 3).

La cuantificación del PHA liberado al medio extracelular como consecuencia de la lisis de *P. putida* KT2440 tras 24 h de infección resultó ser similar al contenido de PHA al inicio de la infección con el predador (0,45 g/l y 0,84 g/l, respectivamente), es decir, un 50 % del PHA acumulado por la presa (Tabla 3).

25

A las 24 h de cocultivo también se liberan 0.2 ± 0.02 g/l de RHAs: monómeros, dímeros y trímeros (Tabla 3).

Con el objetivo de purificar el PHA liberado al medio de cultivo se centrifugaron 30 ml del co-cultivo de *B. bacteriovorus* HD100 sobre *P. putida* KT2440 y se resuspendieron directamente en etil-acetato. Tras la precipitación del polímero con metanol, se cuantificó el contenido de PHA extraído, siendo de 0.4 g/l con una pureza del 99%. Este resultado indica que el proceso aquí descrito permite la recuperación de casi el 100% del PHA previamente liberado al sobrenadante del cultivo, lo que corresponde a un 50% del PHA producido por *P. putida* KT2440.

TABLA 3.

Cultivos	Biomasa 0 h (g l ⁻¹)	Contenido PHA 0 h (g l ⁻¹)	Contenido PHA en el sedimento 24 h (g l ⁻¹)	Productos de hidrólisis del PHA en el sobrenadante 24 h (g l ⁻¹) (RHAs)	Viabilidad de la presa 24 h (10 ⁸ cfu ml ⁻¹)	Viabilidad de <i>Bdellovibrio</i> 24 h (10 ⁸ pfu ml ⁻¹)
<i>Pseudomonas putida</i>						
KT2442 (Bd-) ^a	1.33 ± 0.11	0.84 ± 0.1	0.75 ± 0.0	< 0.05	3.6 ± 1.5	0
KT2442 + Bd	1.33 ± 0.11	0.84 ± 0.1	0.45 ± 0.1 ^c	0.2 ± 0.03	0.001 ± 0.0	15.4 ± 3

^a Cultivos control de las presas sin depredador

A tiempo cero, la viabilidad de las presas es de 3·10⁸ ufc/ml

Los RHAs se purificaron según un método descrito anteriormente (Ruth *et al.*, 2007. *Biomacromolecules*, 8: 279-286). Brevemente, los RHAs se pueden separar mediante una columna cromatográfica de C18 de fase reversa y las fracciones resultantes se acidifican, se realizan extracciones líquido-líquido y se evapora el sovente, obteniendo así el RHA puro. El rendimiento de este método es superior al 75%.

EJEMPLO 4. Producción de PHB en *Cupriavidus necator* H16

10

Para estudiar la producción de PHB en la cepa de *Cupriavidus necator* H16 se cultivó la bacteria en una sola fase fermentativa en un medio rico según se describe en el Ejemplo 1. La cepa es capaz de crecer y acumular 0.9 g/l PHB en esas condiciones fermentativas.

15

EJEMPLO 5. Lisis de *Cupriavidus necator* H16 mediada por *B. bacteriovorus* HD100

El sistema lítico del presente ejemplo consiste en el crecimiento de *B. bacteriovorus* HD100 sobre *C. necator* H16 crecida en condiciones de producción de PHB (ver Ejemplo 4).

La cuantificación del PHB liberado al medio extracelular como consecuencia de la lisis de *C. necator* H16 tras 24 h de infección con el predador resultó ser igual o superior al 50% del total del PHB previamente acumulado por la presa (0.5 y 0.9 g/l PHB, respectivamente).

Con el objetivo de purificar el PHB liberado al medio de cultivo se centrifugaron 30 ml del co-cultivo de *B. bacteriovorus* HD100 sobre *C. necator* H16 y se resuspendieron directamente en 1 ml de cloroformo. Tras la precipitación del polímero con metanol, se cuantificó el contenido de PHB extraído, siendo de 0.15 g/l con una pureza del 99%.

35

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de extracción de un bioproducto seleccionado
5 del grupo que consiste en polihidroxialcanoato (PHA),
hidrolizado de PHA y una cualquiera de sus mezclas, y obtenido
por fermentación de una bacteria productora presa, caracterizado
dicho procedimiento de extracción porque comprende mezclar la
bacteria productora presa que contiene el bioproducto en su
10 interior con una bacteria predadora en un medio que comprende
una fuente de Ca y Mg.
2. Procedimiento de extracción según la reivindicación anterior,
donde la bacteria predadora pertenece al grupo de los BALOs.
- 15 3. Procedimiento de extracción según la reivindicación 2, donde
la bacteria predadora es *Bdellovibrio bacteriovorus* HD100.
4. Procedimiento de extracción según una cualquiera de las
20 reivindicaciones 1 a 3, donde la bacteria productora presa es
una bacteria Gram-negativa.
5. Procedimiento de extracción según la reivindicación 4, donde
la bacteria Gram-negativa es *Pseudomonas putida* KT2440.
- 25 6. Procedimiento de extracción según la reivindicación 4, donde
la bacteria Gram-negativa es *Cupriavidus necator* H16.
7. Procedimiento de extracción según una cualquiera de las
30 reivindicaciones 1 a 6, que comprende adicionar la bacteria
predadora a un medio de cultivo que comprende una fuente de Ca y
Mg donde se encuentra la bacteria productora presa que contiene
el bioproducto en su interior.
- 35 8. Método de obtención de un bioproducto seleccionado del grupo
que consiste en polihidroxialcanoato (PHA), hidrolizado de PHA y
una cualquiera de sus mezclas por fermentación de una bacteria
productora presa, caracterizado dicho método porque comprende:

- a) cultivar la bacteria productora presa en un medio de cultivo para producir el bioproducto,
b) extraer el bioproducto obtenido en la etapa a) mediante el procedimiento de extracción descrito en una cualquiera de las
5 reivindicaciones 1 a 7, y
c) aislar el bioproducto.

9. Método de obtención según la reivindicación 8, donde la etapa
a) comprende cultivar *Pseudomonas putida* KT2440 en un medio
10 mínimo de cultivo para producir una mezcla de PHA e hidrolizado de PHA.

10. Método de obtención según una cualquiera de las
reivindicaciones 8 o 9, donde la etapa c) comprende aislar PHA.
15

11. Método de obtención según una cualquiera de las
reivindicaciones 8 a 9, donde la etapa c) comprende aislar el
hidrolizado de PHA.

20 12. Método de obtención según la reivindicación 8, donde el
bioproducto se selecciona del grupo que consiste en
polihidroxialcanoato (PHA), hidrolizado de PHA y una cualquiera
de sus mezclas, y el método comprende:

- a) cultivar la bacteria productora presa en un medio rico de
25 cultivo en el que se produce el bioproducto,
b) extraer el bioproducto obtenido en la etapa a) mediante el
procedimiento de extracción descrito en una cualquiera de las
reivindicaciones 1 a 7, y
c) aislar el bioproducto.

30

13. Método de obtención según la reivindicación 12, donde la
etapa a) comprende cultivar *Cupriavidus necator* en un medio rico
de cultivo (NB) suplementado con gluconato sódico para producir
una mezcla de PHA e hidrolizado de PHA.

35

14. Método de obtención según una cualquiera de las
reivindicaciones 12 a 13, donde la etapa c) comprende aislar PHA
o el hidrolizado de PHA.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2013/070674

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12P, C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, INVENES, WPI, MEDLINE, BIOSIS, HCAPLUS, BD-TXTE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	MARTINEZ VIRGINIA et al. Reward for <i>Bdellovibrio bacteriovorus</i> for preying on a polyhydroxyalkanoate producer. Environmental Microbiology, 2013. Vol. 15 (4) páginas 1204-1215. ISSN 1462-2912 (print) ISSN 1462-2920(electronic) Doi:10.1111/1462-2920.12047	1-4, 7
A	ES 2370947 A1 (CONSEJO SUPERIOR INVESTIGACION) 26/12/2011, page 1, line 66; page 3, line 49; page 7, line 25-line 67.	1, 4, 5, 8-10
A	MARTINEZ VIRGINIA et al. Identification and Biochemical Evidence of a Medium-Chain-Length Polyhydroxyalkanoate Depolymerase in the <i>Bdellovibrio bacteriovorus</i> . Predatory Hydrolytic Arsenal. Applied and Environmental Microbiology SEP 2012. Vol. 78 (17) Páginas: 6017-6026. ISSN 0099-2240 (print) ISSN 1098-5336 (electronic) Doi:10.1128/AEM.01099-12	1-5, 7
A	KANASUNDARI, B. y SUDESH, K. Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates. Polymer Letters, 2011, vol. 5 (7), pages 620-634.	1, 5, 6

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.	
"E" earlier document but published on or after the international filing date	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
17/12/2013

Date of mailing of the international search report
(27/12/2013)

Name and mailing address of the ISA/

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Facsimile No.: 91 349 53 04

Authorized officer
A. Polo Diez

Telephone No. 91 3495524

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2013/070674

Information on patent family members

Information on patent family members			
Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
ES2370947 A1 -----	26.12.2011 -----	WO2011086211 A1 -----	21.07.2011 -----

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2013/070674

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12P39/00 (2006.01)

C12P7/62 (2006.01)

C12N1/06 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2013/070674

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver Hoja Adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)
C12P, C12N

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPODOC, INVENES, WPI, MEDLINE, BIOSIS, HCAPLUS, BD-TXTE

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
P, X	MARTINEZ VIRGINIA et al. Reward for <i>Bdellovibrio bacteriovorus</i> for preying on a polyhydroxyalkanoate producer. Environmental Microbiology, 2013. Vol. 15 (4) páginas 1204-1215. ISSN 1462-2912 (print) ISSN 1462-2920(electronic) Doi:10.1111/1462-2920.12047	1-4, 7
A	ES 2370947 A1 (CONSEJO SUPERIOR INVESTIGACION) 26/12/2011, página 1, línea 66;página 3, línea 49; página 7, línea 25-línea 67.	1, 4, 5, 8-10
A	MARTINEZ VIRGINIA et al. Identification and Biochemical Evidence of a Medium-Chain-Length Polyhydroxyalkanoate Depolymerase in the <i>Bdellovibrio bacteriovorus</i> . Predatory Hydrolytic Arsenal. Applied and Environmental Microbiology SEP 2012. Vol. 78 (17) páginas: 6017-6026. ISSN 0099-2240 (print) ISSN 1098-5336 (electronic) Doi:10.1128/AEM.01099-12	1-5, 7
A	KANASUNDARI, B. y SUDESH, K. Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates. Polymer Letters, 2011, vol. 5 (7), páginas 620-634.	1, 5, 6

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T"	documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&"	documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.		
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.		

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
17/12/2013

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
27 de diciembre de 2013 (27/12/2013)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado
A. Polo Diez
Nº de teléfono 91 3495524

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

PCT/ES2013/070674

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
ES2370947 A1 -----	26.12.2011 -----	WO2011086211 A1 -----	21.07.2011 -----

CLASIFICACIONES DE INVENCION

C12P39/00 (2006.01)

C12P7/62 (2006.01)

C12N1/06 (2006.01)