



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 339 725**

51 Int. Cl.:

C12P 7/62 (2006.01)

C08G 63/88 (2006.01)

C08G 63/89 (2006.01)

C08G 63/90 (2006.01)

C08G 63/91 (2006.01)

C08L 67/04 (2006.01)

C08G 63/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **99916498 .1**

96 Fecha de presentación : **08.04.1999**

97 Número de publicación de la solicitud: **1070135**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **24.01.2001**

54

Título: **Métodos para la separación y purificación de biopolímeros.**

30

Prioridad: **08.04.1998 US 81112 P**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
24.05.2010

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
24.05.2010

73

Titular/es: **METABOLIX, Inc.**
21 Erie Street
Cambridge, Massachusetts 02139, US

72

Inventor/es: **Horowitz, Daniel M. y**
Brennan, Elaine, M.

74

Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

ES 2 339 725 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos para la separación y purificación de biopolímeros.

5 Antecedentes de la invención

La presente invención pertenece generalmente al campo de los procedimientos de separación para polímeros, y más específicamente a la purificación de polímeros derivados de fuentes biológicas.

10 Los polihidroxialcanoatos (PHA) son poliésteres termoplásticos que se pueden producir a partir de bacterias o planas (Williams y Peoples, *CHEMTECH* 26:33-44 (1996)). Estos polímeros se pueden recuperar de los sistemas biológicos (la biomasa) mediante procedimientos con disolventes orgánicos, procedimientos acuosos, o una combinación tanto de un procedimiento con disolventes orgánicos como acuoso. En las patentes U.S. n° 4.310.684 y n° 4.705.604 de Vanlautem *et al.* (extracción de PHB a partir de microbios con disolventes clorados), en la patente U.S. n° 4.968.611 de Traussnig *et al.* (uso de dioles, trioles acetalizados, ésteres de ácidos di- o tricarbónicos o buritolactona para extraer poli-3-hidroxiobutirato (PHB) y sus copolímeros a partir de microbios), en la patente U.S. n° 5.213.976 de Blauhut *et al.* (procedimiento para extraer PHB a partir de células microbianas usando cloruro de metileno seguido de la precipitación del PHB en agua), en los documentos PCT WO 97/15681, PCT WO 93/11656 (uso de acetona para extraer polímero de poli-3-hidroxiocanoato a partir de *Pseudomonas oleovorans*), PCT WO 96/06179 y PCT WO 97/15681 (métodos con disolventes para recuperar PHA a partir de cosechas de plantas transgénicas), y en la patente U.S. n° 5.821.299 de Noda (uso de mezclas de disolvente/no disolvente parcial para extraer PHA a partir de biomasa) se describen ejemplos de procedimientos conocidos de recuperación con disolventes orgánicos. Típicamente, en cada uno de estos procedimientos de la técnica anterior, algunos de los componentes de la biomasa se co-extraen con el PHA, lo que puede provocar que el producto de PHA se decolore y/o tenga un olor desagradable.

25 En algunos casos, es útil extraer los PHA a partir de la biomasa usando técnicas de procesamiento acuoso, en las que el polímero permanece en un estado de micropartículas, y la biomasa que no es PHA se solubiliza mediante tratamientos mecánicos, químicos y/o enzimáticos. Las partículas de PHA se separan entonces del material solubilizado usando centrifugación, filtración, flotación, u otros métodos conocidos.

30 El documento PCT WO 97/15681 describe el uso de ozono o peróxidos de alquilo como agentes químicos para modificar PHA, es decir, formar derivados de PHA, como parte de un procedimiento para extraer PHA a partir de biomasa de semillas para la producción de aceite. La referencia no dice cómo desodorizar, blanquear o degradar la biomasa que no es PHA.

35 El documento EP 0145233, por ejemplo, describe métodos acuosos para purificar un polímero de 3-hidroxiobutirato microbiológico, en los que las células se tratan con calor a temperaturas por encima de 80°C y después se digieren con enzimas, tensioactivos, y/o peróxido de hidrógeno. La patente U.S. n° 5.110.980 de Ramsey *et al.* describe el uso de hipoclorito para disolver la biomasa que no es PHA. La patente U.S. n° 5.691.174 de Liddell *et al.* describe un método para purificar poliésteres microbianos usando la combinación de peróxido de hidrógeno con un agente quelante. Sin embargo, la desventaja de estos métodos es que el tratamiento con el peróxido se debe de llevar a cabo a temperaturas elevadas, por ejemplo 80-180°C, lo que requiere un intenso calentamiento y enfriamiento del producto, y, en algunos casos, requiere un equipo de alta presión. Además, frecuentemente se encuentra que el peróxido de hidrógeno es inestable en presencia de niveles elevados de biomasa celular, lo que da como resultado que el peróxido de hidrógeno se descomponga de forma no productiva en agua y oxígeno y genere una espuma voluminosa. Otro inconveniente es que las elevadas temperaturas prolongadas y el peróxido de hidrógeno también pueden provocar una disminución del peso molecular de los polímeros, y en algunos casos pueden promover la cristalización de los polímeros, lo que es indeseable para la producción de un látex polimérico amorfo.

50 Como se explica anteriormente, los PHA derivados de biomasa pueden tener olores desagradables. El documento PCT WO 94/02541 describe aditivos para enmascarar el olor procedente de los PHA producidos, por ejemplo como se describe en el documento EP 0145233 y en la patente U.S. n° 5.691.174 de Liddell *et al.* Sería ventajoso eliminar el olor asociado con los PHA recuperados de la biomasa, particularmente si la eliminación del olor se pudiese llevar a cabo durante el procedimiento de recuperación, eliminando de ese modo la necesidad de aditivos que enmascaran el olor en la resina de PHA.

55 Por lo tanto, es un objeto de la presente invención proporcionar métodos mejorados para purificar polihidroxialcanoatos derivados de biomasa.

60 Se describe cómo potenciar la extracción de polihidroxialcanoatos a partir de biomasa que contiene polihidroxialcanoatos usando sistemas de disolventes orgánicos, sistemas de disolventes acuosos, o sus combinaciones.

Se describen métodos de extracción que reducen la exposición de los polímeros de PHA a condiciones que pueden disminuir el peso molecular de los polímeros.

65 Es un objeto adicional de la presente invención eliminar olores en el procedimiento de recuperación de polihidroxialcanoatos a partir de biomasa.

Es otro objeto de la invención una composición de PHA según la reivindicación 17 aneja.

Sumario de la invención

5 Se proporcionan métodos para la recuperación y purificación de polihidroxicanoatos (PHA) a partir de biomasa vegetal y microbiana que contiene PHA, en los que los métodos incluyen poner en contacto la biomasa o el PHA parcialmente purificado con entre 0,002 y 0,1 g de ozono por gramo de biomasa que contiene PHA o de PHA parcialmente purificado, en al menos una etapa de un procedimiento de purificación. El ozono tiene los efectos beneficiosos de (a) blanquear, (b) desodorizar, y (c) solubilizar impurezas, facilitando su eliminación de suspensiones o látex poliméricos acuosos. El tratamiento con ozono se puede usar solo o en combinación con otro tratamiento, extracción, y procedimientos de separación, y es especialmente adecuado para el tratamiento de látex, lechadas, suspensiones y disoluciones de disolventes orgánicos que contienen PHA. La etapa de la puesta en contacto con ozono se puede llevar a cabo ventajosamente a lo largo de un amplio intervalo de temperaturas, incluyendo temperaturas de procesamiento, por ejemplo entre alrededor de 1 y 40°C, que son menores que las temperaturas de procesamiento usadas en métodos conocidos. El tratamiento con ozono de la biomasa que contiene PHA, del PHA parcialmente purificado, o del PHA extraído con disolventes, produce un mejor nivel de pureza polimérica adecuada para aplicaciones de revestimiento y otras aplicaciones. El tratamiento con ozono también tiene la ventaja añadida de que el polímero o látex polimérico de PHA resultante está esencialmente libre de olores.

20 Descripción detallada de la invención

Se han desarrollado métodos mejorados para la recuperación de polihidroxicanoatos (PHA) a partir de biomasa que incluye PHA. Los métodos incluyen tratar la biomasa o el PHA parcialmente purificado con entre 0,002 y 0,01 g de ozono por gramo de biomasa que contiene PHA o de PHA parcialmente purificado, en al menos una etapa de un procedimiento de purificación. El tratamiento con ozono se puede aplicar de forma beneficiosa a los PHA procedentes de cualquier fuente, incluyendo los PHA extraídos usando disolventes orgánicos (por ejemplo, tratando una disolución de disolvente orgánico de los PHA), a fin de purificar y/o desodorizar adicionalmente los PHA.

Polihidroxicanoatos

30 Los PHA se pueden producir en un número de sistemas biológicos, incluyendo bacterias y cosechas de plantas manipuladas mediante ingeniería genética. En sistemas bacterianos, los PHA se acumulan intracelularmente como cuerpos de inclusión granulares. El PHA también se puede producir en cosechas vegetales manipuladas mediante ingeniería genética. Los métodos para construir tales cosechas se describen, por ejemplo, en las patentes U.S. nºs 5.245.023 y 5.250.430 de Peoples y Sinskey, en la patente U.S. nº 5.502.273 de Bright *et al.*, en la patente U.S. nº 5.534.432 de Peoples y Sinskey, en la patente U.S. nº 5.602.321 de John, en la patente U.S. nº 5.610.041 de Somerville *et al.*, en los documentos PCT WO 91/00917, PCT WO 92/19747, PCT WO 93/02187, PCT WO 93/02194, PCT WO 94/12014, Poirier *et al.*, *Science* 256:520-23 (1992); van der Leij y Witholt, *Can. J. Microbiol.* 41(sup.):222-38 (1995); Nawrath y Poirier, *The International Symposium on Bacterial Polyhydroxyalkanoates*, (Eggink *et al.*, eds.) Davos Suiza (18-23 de agosto de 1996); y Williams y Peoples, *CHEMTECH* 26: 38-44 (1996). Los métodos para recuperar los PHA a partir de biomasa vegetal se describen, por ejemplo, en los documentos PCT WO 97/15681, PCT WO 97/07239, y PCT WO 97/07229.

45 La biomasa que contiene PHA derivada de bacterias o plantas que se va a usar en los métodos descritos aquí típicamente está en forma de una suspensión, látex o disolución polimérica. La suspensión, látex o disolución polimérica tiene preferiblemente un contenido de sólidos entre alrededor de 1 y 90% en peso, y más preferiblemente entre alrededor de 5 y 50% en peso.

50 De forma similar, los métodos de purificación con ozono descritos aquí son útiles para la purificación de otros PHA, independientemente del organismo fuente o de la composición de comonomeros. Los PHA representativos incluyen poli-3-hidroxi-butarato (PHB), poli-3-hidroxi-butarato-co-3-hidroxi-valerato (PHBV, comercializado como BIOPOL™ por Monsanto), poli-3-hidroxi-butarato-co-4-hidroxi-butarato, poli-3-hidroxi-propionato, poli-3-hidroxi-butarato-co-3-hidroxi-propionato, poli-4-hidroxi-butarato, poli-3-hidroxi-butarato-co-3-hidroxi-hexanoato, poli-3-hidroxi-butarato-co-3-hidroxi-octanoato, poli-5-hidroxi-valerato, y poli-6-hidroxi-hexanoato.

Ozono

60 El ozono (O₃), también denominado como "oxígeno activado", es una forma alotrópica de oxígeno, y es uno de los oxidantes más fuertes conocido. Se puede generar mediante cualquier método conveniente, tal como descarga en corona o irradiación con UV, aplicado a una corriente de aire, de oxígeno, o de aire enriquecido con oxígeno, como se describe, por ejemplo, en las patentes U.S. nº 5.855.856 de Carlson y nº 5.766.560 de Cole (descarga en corona), y en las patentes U.S. nº 4.517.084 de Pincon, 4.329.212, nº 4.427.636 de Obenshain, nº 4.317.044 de Vaseen (irradiación con UV).

65 Preferiblemente, el ozono se aplica a la biomasa o disolución que contiene PHA en una corriente de oxígeno (O₂) que contiene entre alrededor de 1 y 10%, y más preferiblemente entre alrededor de 2 y 5%, de ozono.

El ozono ventajosamente es activo a temperaturas ambiente, y se puede generar económicamente *in situ* a partir de aire u oxígeno. El ozono se genera preferiblemente en el sitio de extracción del PHA.

5 Métodos de purificación de PHA usando ozono

En una realización preferida, la biomasa que contiene PHA (de origen microbiano, vegetal, u otro origen) se trata con entre 0,002 y 0,1 g de ozono por gramo de biomasa que contiene PHA con el fin de blanquear, esterilizar, solubilizar/oxidar impurezas, y/o desodorizar. La corriente gaseosa que contiene ozono se puede introducir en la fase fluida que contiene el polímero rociando, mediante inyección con boquilla, o por otro medio seleccionado para proporcionar una transferencia eficiente de masa del ozono.

El tratamiento con ozono es eficaz en cualquier etapa de un procedimiento de aislamiento de PHA para los PHA, que puede comprender una o más etapas de tratamiento y/o de separación. En un procedimiento acuoso, el ozono se puede usar individualmente o en combinación con otras operaciones, tales como tratamiento térmico, tratamiento enzimático (por ejemplo, nucleasa, proteasa, o glicosidasa), tratamiento mecánico (por ejemplo, homogeneizador o microfluidizador), tratamiento químico (por ejemplo, tensioactivo, hipoclorito, o peróxido), centrifugación, filtración y/o flotación. El ozono tiene un potente efecto blanqueante y desodorizante en cualquier punto de tal procedimiento de tratamiento; sin embargo, para una eficacia máxima, puede ser deseable que el tratamiento con ozono se efectúe después de la lisis y eliminación parcial de la biomasa que no es PHA.

El tratamiento con ozono tiene un potente efecto blanqueante y desodorizante cuando se aplica a cualquiera de las diversas etapas de un procedimiento de aislamiento de PHA. Por ejemplo, el ozono se puede aplicar (a) a una suspensión acuosa de células completas, (b) a una suspensión acuosa de polímero bruto tras la homogeneización, el tratamiento con lisozima/proteasa, y el lavado, (c) a una suspensión acuosa de polímero bruto tras la homogeneización, el tratamiento con lisozima/proteasa, el lavado, el blanqueado con peróxido de hidrógeno, y el lavado, y (d) a una disolución de disolvente orgánico que contiene PHA generada, por ejemplo, usando un procedimiento descrito en la patente U.S. n° 4.310.684 y n° 4.705.604 de Vanlautem *et al.*, en la patente U.S. n° 4.968.611 de Traussnig *et al.*, en la patente U.S. n° 5.213.976 de Blauhut *et al.*, en la patente U.S. n° 5.821.299 de Noda, en los documentos PCT WO 93/11656, PCT WO 96/06179, o PCT WO 97/15681. Tras el tratamiento con ozono, la suspensión que contiene el polímero se puede purificar mediante microfiltración con un lavado con agua. El ozono efectúa una solubilización significativa del material que no es PHA, como se muestra por una disminución del contenido de ceniza. (Los polímeros de PHA se volatilizan de forma limpia a aproximadamente 300°C, mientras que otros contenidos celulares, tales como ADN y proteína, producen ceniza a una temperatura próxima a esta temperatura).

El tratamiento con ozono se puede llevar a cabo en presencia de diversos aditivos funcionales útiles para la estabilización y/o purificación de látex y suspensiones de PHA. Los ejemplos de estos aditivos incluyen tensioactivos, detergentes, emulsionantes, dispersantes, agentes antiespumantes o desespumantes, agentes para el control del pH, y quelantes. Para suspensiones poliméricas acuosas, el pH de la suspensión generalmente no es vital para el tratamiento exitoso con ozono. No obstante, es deseable un pH aproximadamente neutro para mantener una suspensión polimérica estable y/o para precipitar impurezas solubles.

La formación de espuma puede ser un efecto secundario del tratamiento con ozono, debido a la introducción de una corriente de gas tremendamente insoluble en la suspensión polimérica. Puesto que la espumación puede ser desventajosa para la producción de látex estables y uniformes, típicamente es necesario añadir emulsionantes/dispersantes y agentes antiespumantes inmediatamente antes del tratamiento con ozono. Preferiblemente, el ozono se aplica en una forma tan concentrada como sea práctico (por ejemplo, una corriente que tenga más de 1% de O₃ en oxígeno/aire), a fin de minimizar la formación de espuma desde el gas portador inerte.

En una realización preferida, el tratamiento con ozono, de entre 0,002 y 0,1 g de ozono por gramo de biomasa que contiene PHA, se aplica en combinación con el blanqueamiento mediante peróxido de hidrógeno de la biomasa que contiene PHA. Sin estar atados por la teoría, parece que el ozono ataca preferentemente a impurezas que contienen anillos insaturados y/o aromáticos, mientras que el peróxido de hidrógeno reacciona, vía un anión peroxilo, con especies electrófilas. El efecto es hacer que las impurezas sean mucho más solubles en agua (y por tanto más fáciles de separar de las suspensiones poliméricas mediante filtración o centrifugación) y mucho menos coloreadas u olorosas. Adicionalmente, el ozono, cuando se aplica antes de un tratamiento a base de peróxido de la suspensión polimérica, prolonga de forma útil el tiempo de vida del peróxido en disolución, e incrementa la eficacia del tratamiento con peróxido.

La cantidad de ozono a utilizar depende del efecto deseado sobre el producto final, así como de la forma de la biomasa que contiene PHA que se trata. Por ejemplo, una lechada, suspensión o látex a base de agua puede requerir una dosis relativamente elevada de ozono para completar esencialmente la decoloración, por ejemplo entre alrededor de 0,002 y 0,1 g de ozono por gramo de biomasa que contiene PHA. Sin embargo, una disolución homogénea relativamente pura de PHA en un disolvente orgánico se puede tratar para reducir el olor y el color con una dosis más modesta, por ejemplo entre alrededor de 0,002 y 0,01 g de ozono por gramo de soluto.

ES 2 339 725 T3

Aplicaciones usando los PHA purificados

La mejora de los métodos de recuperación y purificación de PHA es muy ventajosa, ya que los PHA se pueden procesar para uso en una enorme variedad de aplicaciones. Es evidente que el ozono puede ser especialmente útil para aquellas aplicaciones en las que una pureza elevada, una esterilidad, un bajo olor, o un bajo resto de ceniza son importantes. En algunos casos, el látex o suspensión purificados serán útiles ellos mismos como un producto, mientras que en otros casos puede ser ventajoso aislar el polímero ozonado en forma seca para la conformación y el procesamiento.

Las suspensiones o látex de PHA tratados con ozono pueden ser útiles para cualquiera de las diversas aplicaciones para las que se proponen los PHA, tales como objetos biodegradables, revestimientos y aditivos alimentarios, lacas para tubos de rayos catódicos (CRT), aglutinantes cerámicos y metálicos en polvo, microesferas, implantes y dispositivos biomédicos, y artículos procesados en estado fundido, tales como los descritos en la patente U.S. n° 5.525.658 de Liddell *et al.*

Una aplicación particularmente adecuada para el látex de PHA tratado con ozono es una laca para CRT. La laca se usa para formar un sustrato liso sobre la superficie de las partículas de fósforo del CRT, que permite la deposición subsiguiente de una capa de aluminio reflectante, seguido de la volatilización térmica del sustrato polimérico (documento PCT WO 96/17369). Esta aplicación se basa en la capacidad de los PHA puros para descomponerse térmicamente y volatilizarse a temperaturas de aproximadamente 300°C. En esta aplicación es necesario un nivel elevado de purificación para usar los látex de PHA, ya que los restos celulares, tales como proteína y ácido nucleico, pueden dejar un residuo carbonizado sobre el panel de CRT tras la cocción, dando como resultado una mala calidad de la imagen. La utilidad de un látex de PHA para aplicación como una laca de CRT se puede juzgar en parte a partir de un análisis de ceniza realizado a 450°C en atmósfera de aire, condiciones que se aproximan a las usadas en la metalización del CRT. Los látex tratados con ozono, y especialmente aquellos tratados con la combinación de ozono seguido de peróxido de hidrógeno, tienen contenidos de ceniza excepcionalmente bajos al cocerlos, y son muy adecuados para el uso como lacas de CRT.

Las composiciones y métodos de preparación y su uso descritos aquí se describen adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplo 1

35 *Producción de PHA en Pseudomonas putida*

Se fermentaron células de *Pseudomonas putida* hasta una densidad de 76 g/l mediante crecimiento en ácido octanoico en medio de sales minerales mínimo. En estas condiciones, las células acumulan típicamente entre 30 y 60% de PHA en una base en peso seco de la célula, con el ácido R-3-hidroxi octanoico como el comonomero principal. La muestra, que consiste en 48 l, se lavó mediante diafiltración a volumen constante con agua desionizada, usando un aparato de microfiltración transversal cerámico (Niro Inc.). Entonces se añadió nucleasa comercial (BENZONASE™, disponible de American International Chemical, 10 µl/l de células), el pH se ajustó a 10 con amoníaco, y las células se destruyeron haciendo pasar dos veces la muestra a través de un microfluidizador M-110EH (Microfluidics International Corp.) a una presión de funcionamiento de 15.000 psi. El lisado se digirió con (a) lisozima de huevo de pollo (Sigma Chemical Co., 0,2 g/l, pH 7,0, 45°C, 1 h, 20 mM de EDTA añadido); (b) ALCALASE™ (Novo Nordisk, 1 ml/l, pH 7,5, 50°C, 2 h); y (c) FLAVOURZYME™ (Novo Nordisk, 1 g/l, pH 7,2, 50°C, 8 h). Las digestiones con ALCALASE™ y FLAVOURZYME™ se llevaron a cabo en presencia de 0,5% de BRIJ™ 721 (ICI Surfactants). Tras el tratamiento con FLAVOURZYME™, la muestra de PHA se lavó mediante diafiltración a volumen constante con agua que contiene 0,25% de BRIJ™ 721, y después se concentró hasta un volumen de 16 l.

Ejemplo 2

55 *Tratamiento con ozono del látex bruto de PHA*

La mitad del látex bruto de PHA procedente del Ejemplo 1 (8 l) se diluyó 1:1 con agua desionizada. Después, se añadió BRIJ™ 721 hasta 0,5% peso/volumen, y el látex se roció con una corriente de oxígeno que contiene ozono (4 pies cúbicos estándar por hora, 3-4% de ozono) durante 8 h a temperatura ambiente, pH 7, con agitación vigorosa. Tras la ozonización, el látex se lavó para eliminar impurezas solubilizadas mediante diafiltración a volumen constante con agua que contiene 0,25% de BRIJ™ 721.

El látex lavado se trató entonces adicionalmente con peróxido de hidrógeno, 3% peso/vol., a 80°C, con adición de 0,5% de BRIJ™ 721 y 0,01% de DTPA (ácido dietilentriaminopentaacético), hasta que esencialmente se agotó todo el peróxido (15 h). El producto se lavó para eliminar impurezas solubilizadas mediante diafiltración a volumen constante con agua que contiene 0,25% de BRIJ™ 721. El producto final procedente del lavado contenía 0,8% de ceniza (peso/peso en base en sólidos) tras la descomposición del polímero a 450°C en aire.

ES 2 339 725 T3

Ejemplo 3

Tratamiento con peróxido sin ozonización (ejemplo comparativo)

5 La mitad del látex bruto de PHA procedente del Ejemplo 1 (8 l) se diluyó 1:1 con agua desionizada. Se añadieron BRIJ™ 721 (0,5%) y DTPA (0,01%), y el látex se trató entonces con peróxido de hidrógeno, 3% peso/vol., a 80°C hasta que esencialmente todo el peróxido se agotó (7 h). El producto se lavó para eliminar impurezas solubilizadas mediante diafiltración a volumen constante con agua que contiene 0,25% de BRIJ™ 721. El producto final del lavado contenía 4,6% de ceniza (peso/peso en una base en sólidos) tras la descomposición del polímero a 450°C en aire.

10

Ejemplo 4

Tratamiento con ozono tras el tratamiento con peróxido

15

El producto derivado como en el Ejemplo 3 se roció con una corriente de oxígeno que contiene ozono (4 pies cúbicos estándar por hora (110 litros/hora), 3-4% de ozono) durante 8 h a temperatura ambiente, pH 7, con agitación vigorosa. Tras la ozonización, el látex se lavó para eliminar impurezas solubilizadas mediante diafiltración a volumen constante con agua que contiene 0,25% de BRIJ™ 721. El producto final del lavado contenía 0,9% de ceniza (peso/peso en una base en sólidos) tras la descomposición del polímero a 450°C en aire.

20

Ejemplo 5

Preparación de látex de PHA con un bajo contenido de ceniza

Células de *Pseudomonas putida* se fermentaron hasta una densidad de 80 g/l mediante crecimiento en ácido octanoico en medio de sales minerales mínimo. La muestra, que consiste en 46 l, se lavó mediante diafiltración a volumen constante con agua desionizada, y se concentró hasta un volumen de 20 l. Entonces se añadió nucleasa comercial (BENZONASE™, 10 µl/l de células), el pH se ajustó a 10 con amoníaco, y las células se destruyeron haciendo pasar dos veces la muestra a través de un microfluidizador M-110EH (Microfluidics International Corp.) a una presión de funcionamiento de 15.000 psi. El lisado se digirió con lisozima de huevo de pollo (0,2 g/l, pH 7,0, 45°C, 1 h, 20 mM de EDTA añadido), seguido de ALCALASE™ (1 ml/l, pH 7,5, 50°C, 10 h, 0,3% de BRIJ™ 721 añadido). Tras el tratamiento con ALCALASE™, la muestra se lavó mediante diafiltración a volumen constante con agua que contiene 0,1% de BRIJ™ 721.

30

Se añadió BRIJ™ 721 hasta 0,2% peso/vol., y después el látex se roció con una corriente de oxígeno que contiene ozono (4 pies cúbicos estándar por hora (110 litros/hora), 3-4% de ozono) durante 10 h a temperatura ambiente, pH 7, con agitación vigorosa. Tras la ozonización, el látex se lavó para eliminar impurezas solubilizadas mediante diafiltración a volumen constante con agua que contiene 0,1% de BRIJ™ 721.

40

El látex lavado se trató entonces adicionalmente con peróxido de hidrógeno, 3% peso/vol., a 80°C, con adición de 0,15% de BRIJ™ 721 y 0,01% de DTPA, hasta que esencialmente todo el peróxido se agotó (18 h). El producto se lavó para eliminar impurezas solubilizadas mediante diafiltración a volumen constante con agua que contiene 0,1% de BRIJ™ 721 (9 vol.) seguido de agua (2 vol.), y después se concentró hasta un contenido de sólidos de 10,7%. El producto final contenía 0,05% de ceniza (peso/peso en una base en sólidos) tras la descomposición del polímero a 450°C en aire.

45

Ejemplo 6

Determinación de ceniza para muestras que contienen PHA

Muestras secas (0,2-1,0 g) se calentaron en aire hasta 450°C a una velocidad de 10°C/min, en vasijas de cuarzo o de aluminio. La temperatura del horno se mantuvo a 450°C durante un período de 45 minutos, después de lo cual las muestras se dejaron enfriar y el residuo no volatilizado se pesó. Las muestras líquidas que contienen agua (contenido en sólidos 0,2-1,0 g) se calentaron en aire hasta 150°C a una velocidad de 10°C/min, y después se mantuvieron a 150°C durante 30 min para evaporar el agua. La temperatura se incrementó entonces hasta 450°C a una velocidad de 10°C/min, y se mantuvo a 450°C durante un período de 45 min. Las muestras se dejaron enfriar entonces. El residuo no volatilizado se midió y se dio como un porcentaje del peso de sólidos presentes en la muestra original.

60

Ejemplo 7

Tratamiento con ozono de una disolución orgánica de PHA

Células de *P. putida* fermentadas, como se describe anteriormente, en ácido octanoico se recogieron mediante centrifugación y se liofilizaron para dar una masa sólida. La masa (440 g) se pulverizó en un molino y se colocó en el

ES 2 339 725 T3

dedal de un extractor Soxhlet. Las células secas se extrajeron en dos lotes durante un total de 16 h con *n*-hexano (2 l), produciendo un extracto ámbar ($A_{273} = 0,457$, dilución 1:9 en hexano) que contenía 26% (peso/volumen) de sólidos. El extracto se aclaró mediante filtración a presión a través de un filtro de microfibras de vidrio de $2 \mu\text{m}$. El extracto (26% peso/volumen en sólidos) se roció entonces con una corriente de gas oxígeno que contiene ozono (8 pies cúbicos estándar por hora (220 litros/hora), *aprox.* 2% de ozono) durante 15 min a temperatura ambiente con agitación. El producto resultante fue un líquido transparente, virtualmente incoloro ($A_{273} = 0,152$, dilución 1:9 en hexano). Una porción del extracto ozonado (0,6 l) se hizo pasar entonces a través de una columna de gel de sílice (*aprox.* 60 g), y se recogió el eluato incoloro (26% peso/volumen en sólidos) ($A_{273} = 0,063$, dilución 1:9 en hexano).

10 Ejemplo 8

Purificación de los PHA disueltos en diclorometano

Se prepararon disoluciones de poli-3-hidroxi-butarato (PHB) (Fluka) y poli-3-hidroxi-butarato-*co*-14%-3-hidroxi-valerato (PHBV) (Aldrich) a 5% (peso/volumen) en diclorometano. Las disoluciones se aclararon mediante filtración a presión a través de un filtro de microfibras de vidrio de $2,6 \mu\text{m}$. Cada disolución (95 ml) se roció entonces con una corriente de gas oxígeno que contiene ozono (8 pies cúbicos estándar por hora (220 litros/hora), *aprox.* 2% de ozono) durante 6 min a temperatura ambiente con agitación. Los productos fueron disoluciones transparentes, virtualmente incoloras. La disolución de PHB tras la ozonización mostró una $A_{273} = 0,714$ (dilución 1:9 en diclorometano) en comparación con $A_{273} = 0,904$ (dilución 1:9 en diclorometano) antes de la ozonización. De forma similar, la disolución de PHBV tras la ozonización mostró una $A_{273} = 0,599$ (dilución 1:9 en diclorometano) en comparación con $A_{273} = 1,029$ (dilución 1:9 en diclorometano) antes de la ozonización.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

