

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 940 123**

51 Int. Cl.:

C08G 63/06 (2006.01)

C12P 7/62 (2006.01)

C08L 101/16 (2006.01)

C08J 5/18 (2006.01)

C08L 67/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.08.2018** **PCT/JP2018/031775**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.03.2019** **WO19044836**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.08.2018** **E 18850182 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.02.2023** **EP 3677613**

54 Título: **Poliéster que contiene unidades de 4-hidroxibutirato**

30 Prioridad:

29.08.2017 JP 2017164468

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

03.05.2023

73 Titular/es:

mitsubishi gas chemical company, inc.
(100.0%)

5-2, Marunouchi 2-chome
Chiyoda-ku, Tokyo 100-8324, JP

72 Inventor/es:

MAEHARA, AKIRA

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 940 123 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

Poliéster que contiene unidades de 4-hidroxibutirato

La presente invención se refiere a un poliéster que comprende una unidad de 3-hidroxibutirato y una unidad de 4-hidroxibutirato y que tiene un alto peso molecular.

5 Muchos microorganismos acumulan polihidroxialcanoatos (PHA) como materiales de reserva de fuente de energía/fuente de carbono en su sistema vivo. Es bien sabido que los PHA se acumulan cuando los nutrientes como nitrógeno, fósforo, azufre, oxígeno y magnesio son limitados mientras que las fuentes de carbono son suficientes. Los PHA son poliésteres termoplásticos que han llamado la atención como un plástico biodegradable y biocompatible, y se han realizado muchos estudios (Documento no de patente 1). Se conocen al menos 100 tipos de unidades monoméricas que constituyen los PHA, entre los que es un notable ejemplo el poli-3-hidroxibutirato (en adelante, abreviado como "P(3HB)"), que comprende (R)-3-hidroxibutirato (en adelante, abreviado como "3HB"). (Documento no de patente 1)

15 P(3HB) tiene un punto de fusión tan alto como el del polipropileno (en adelante abreviado como "PP") y una resistencia a la rotura también tan alta como la del PP; sin embargo, el alargamiento a la rotura del P(3HB) es del 5% o menos, lo que hace que sea un material de alta cristalinidad, duro pero quebradizo. En el caso de que se utilice industrialmente un PHA, los métodos para mejorar las propiedades incluyen un método para introducir una segunda unidad monomérica componente para la copolimerización y un método para aumentar el peso molecular.

20 Para los métodos para introducir un segundo monómero componente para la copolimerización, un ejemplo es un copolímero (en adelante abreviado como "P(3HB-co-4HB)"), en el que se introduce 4-hidroxibutirato (en adelante "4HB"). (Documento no de patente 2)

Los métodos para aumentar el peso molecular incluyen un método para introducir un gen biosintético de P(3HB) (phaCAB) extraído de una bacteria sintetizadora de P(3HB) *Cupriavidus necator* en *Escherichia coli* XL1-Blue, que no tiene sistema de síntesis/sistema de degradación de PHA, y cultivar la bacteria modificada genéticamente a pH 6 para producir P(3HB) de peso molecular ultraalto. (Documento no de patente 3)

25 Típicamente, se dice que el peso molecular promedio en peso Mw de una cepa de tipo salvaje de P(3HB) que produce P(3HB) es aproximadamente de 500.000 a 1.500.000, aproximadamente de 200.000 a 2.000.000, o aproximadamente de 10.000 a 3.000.000, y se considera difícil sintetizar un P(3HB) de peso molecular ultraalto que tenga un Mw de 3.000.000 o superior debido a que un microorganismo de tipo salvaje tiene un gran número de enzimas de degradación en su célula bacteriana. Además, debido a que el P(3HB) se acumula en los microorganismos como un material de reserva de la fuente de energía/ fuente de carbono, al agotarse la fuente de carbono, el P(3HB) se degrada y luego se utiliza. Este fenómeno se ha estudiado para muchos microorganismos. Sin embargo, algunos ejemplos indican la ocurrencia simultánea de síntesis y degradación de PHA. Además, aún no está claro el significado fisiológico de la ocurrencia simultánea de síntesis y degradación de PHA. Además, la ocurrencia simultánea de síntesis y degradación de PHA en una cepa de tipo salvaje productora de PHA es uno de los factores que dificulta la síntesis de PHA de peso molecular ultraalto.

Se ha realizado un gran número de estudios sobre la producción de P(3HB-co-4HB). A *Cupriavidus necator*, que es una cepa de tipo salvaje productora de P(3HB), se alimenta una fuente de carbono, como el ácido 4-hidroxibutírico (4HB), γ -butirolactona, 1,4-butanodiol, 1,6-hexanodiol, 1,8-octanodiol, 1,10-decanodiol y 1,12- dodecanodiol y, después del cultivo, se puede producir P(3HB-co-4HB).

40 Se ha informado sobre un método para producir P(3HB-co-4HB) y/o P(4HB) sometiendo a *E. coli*, que es una bacteria no productora de P(3HB) y no una cepa de tipo salvaje productora de P(3HB), a modificación genética. Inicialmente, cada uno de los genes, phaA, phaB y phaC, respectivamente, de β -cetotiolasa (PhaA), acetoacetyl-CoA reductasa (PhaB) y PHA sintasa (PhaC), que se derivan de *Cupriavidus necator*, que es necesario para producir P(3HB) a partir de acetyl CoA y, además, genes de la ruta de degradación del succinato en *Clostridium kluyveri* (sucD, 4hbD, orfZ) se introdujeron para suministrar 4HB-CoA a partir de ácido succínico para producir P(3HB-co-4HB) que tiene un peso molecular Mw de aproximadamente 1.800.000 en *E. coli* en glucosa como fuente de carbono; sin embargo, la proporción de 4HB en el PHA fue de 1,3 a 1,5%, que fue baja. (Documento no de patente 4)

Además, también se informó del uso de ϵ -caprolactona o 6-hidroxihexanoato (o su sal), que es un producto saponificado de ϵ -caprolactona, para producir P(3HB-co-4HB). En el caso en que *Cupriavidus necator* se cultivó usando ϵ -caprolactona como fuente de carbono, se informó de la acumulación de P(3HB-co-4HB) junto con el contenido de PHA de 26 a 38% y la proporción de 4HB de 30% a 36% (Documento no de patente 5); sin embargo, no se mencionaron pesos moleculares ni ensayos mecánicos.

Además, también se informó de la producción de P(3HB-co-4HB) con alto peso molecular y alta elasticidad (Documento no de patente 6); sin embargo, la resistencia a la rotura no fue suficiente.

55 Además, el Documento de patente 1 describe una composición de resina de poliéster alifático que contiene un polihidroxialcanoato (A), un copolímero que contiene acetato de vinilo (B) y pentaeritritol (C), donde el

polihidroxialcanoato (A) y el copolímero que contiene acetato de vinilo (B) son inmiscibles. La composición de resina de poliéster alifático descrita en el Documento de patente 1 tiene un objeto en el que, superando la cristalización lenta, que es una desventaja de los polihidroxialcanoatos, se mejora la capacidad de procesamiento durante el moldeo, como el moldeo por inyección, y se mejora la velocidad de procesamiento de modo que la pérdida de brillo en el artículo moldeado resultante se puede evitar. En el Documento de patente 1, el objetivo descrito anteriormente se logra mezclando el copolímero que contiene acetato de vinilo (B) y el pentaeritritol (C) y permitiendo que el polihidroxialcanoato (A) y el copolímero que contiene acetato de vinilo (B) sean inmiscibles. En el Documento de patente 1, no se consideran las condiciones requeridas para proporcionar PHA que contiene 4HB que puedan producir una película que tenga una alta resistencia a la rotura y un alto alargamiento a la rotura.

El Documento de patente 2 describe materiales médicos para tejidos blandos, que se forman a partir de un agregado de fibra y un copolímero de poliéster de una unidad de 3-hidroxibutirato y una unidad de 4-hidroxibutirato. El Documento de patente 2 describe que el contenido de unidades 4HB en el copolímero de poliéster 3HB/4HB es típicamente de 30 a 99% en moles, preferiblemente de 40 a 98% en moles, y particularmente preferiblemente de 60 a 95% en moles. Además, el Documento de patente 3 describe un método para producir un copolímero de poliéster que comprende del 97 al 80% en moles de la unidad de 3-hidroxibutirato y del 3 al 20% en moles de la unidad de 4-hidroxibutirato en presencia de bacterias del género *Alcaligenes*. Además, en los Documentos de patente 2 y 3, no se consideran las condiciones requeridas para proporcionar PHA que contiene 4HB que puedan producir una película que tenga una alta resistencia a la rotura y un alto alargamiento a la rotura. El Documento de patente 4 describe un polímero biodegradable que contiene un copolímero de poli-3-hidroxibutirato-co-4-hidroxibutirato, e indica que el peso molecular del copolímero es de 600.000-2.000.000 Daltons, y también describe una película que contiene el polímero.

El Documento de patente 5 describe una mezcla de polímeros que contiene un copolímero de poli-3-hidroxibutirato-co-4-hidroxibutirato, indica que la proporción de 4-hidroxibutirato en el copolímero es 5-15% o 20-50%, y que el peso molecular del copolímero es 50.000-2.500.000 g/mol, y describe una película que contiene el polímero.

Documento de patente 1: WO 2015/098001

Documento de patente 2: JP 07-275344 A

Documento de patente 3: JP 06-181784 A

Documento de patente 4: US 9 353 258 B2

Documento de patente 5: US 2014/051787 A1

Documento no de patente 1: Alistair J. Anderson et al., *Microbiological Reviews*, vol. 54, núm. 4, 450-472, 1990

Documento no de patente 2: Masao Kunioka et al., *Macromolecules*, vol. 22, 694-697, 1989

Documento no de patente 3: S. Kusaka et al., *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 47, 140-143, 1997

Documento no de patente 4: Henry E. Valentin et al., *Journal of Biotechnology*, vol. 58, 33-38, 1997

Documento no de patente 5: Sung Chul Yoon et al., *Korean Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 28, núm. 2, 71-79, 2000

Documento no de patente 6: Kai-Hee Huong et al., *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 124, núm. 1, 76-83, 2017

Se espera que las propiedades físicas de los PHA mejoren mediante la copolimerización y el aumento del peso molecular de los PHA. El P(3HB) tiene propiedades físicas duras y quebradizas, y es improbable que se mejoren las propiedades físicas porque la unidad de 3-hidroxi valerato (3HV) experimenta cocrystalización incluso cuando se somete a copolimerización. Sin embargo, para un copolímero de PHA que comprende una segunda unidad componente que no experimenta cocrystalización con una unidad de 3HB, como una unidad de 4HB y una unidad de 3-hidroxihexanoato (3HH), se espera una mejora significativa de las propiedades físicas al cambiar la proporción del segundo componente unitario. En particular, se sabe que el P(3HB-co-4HB), en el que se copolimerizan unidades 4HB que no tienen cadenas laterales en comparación con las unidades 3HB, experimenta degradación enzimática por lipasas, así como por la enzima que degrada el PHA, mientras que el PHA que comprende unidades 3HB que tienen cadenas laterales u otros 3-hidroxialcanoatos no muestran degradabilidad por lipasas, y se espera que el P(3HB-co-4HB) mejore la degradabilidad en un sistema vivo y se espera su uso como material médico. Sin embargo, entre los métodos de producción que usan cepas de tipo salvaje productoras de PHA que usan 1,4-butanodiol, γ -butirolactona o 4HB, que se han usado comúnmente como precursores de la unidad 4HB, un método para obtener un copolímero de P(3HB-co-4HB) que tiene una proporción de 4HB de 14% en moles a 40% en moles y un peso molecular promedio en peso Mw de 1.250.000 o superior no se conoce. Se ha informado de la producción de P(4HB) que tiene un peso molecular promedio en peso Mw de 2.470.000 y un peso molecular promedio en número Mn de 480.000 para los casos en que se usan bacterias modificadas genéticamente (*Delftia acidovorans*). Hay un informe de producción

de P(3HB-co-4HB) que tiene un peso molecular de 1.800.000 con *E. coli* modificada genéticamente; sin embargo, la proporción de 4HB es solo del 1,3 al 1,5%.

Como se describió anteriormente, no se conoce un método para producir un copolímero de P(3HB-co-4HB) que tiene, por ejemplo, una proporción de 4HB de 14% en moles a 40% en moles y un peso molecular promedio en peso Mw de 1.250.000 o superior, que se espera que mejore significativamente las propiedades físicas.

Dado que una cepa de tipo salvaje productora de PHA degrada y utiliza un PHA acumulado según sea necesario y tiene una enzima de degradación de PHA en su célula, se dice que la síntesis de un PHA de peso molecular ultraalto es difícil y la disminución gradual del peso molecular de PHA durante un período de cultivo se entiende como un fenómeno típico.

En el caso de que se utilice un PHA como material médico, se emplean tecnologías de alta purificación, como la eliminación de endotoxinas. Típicamente, el PHA tiende a degradarse y el peso molecular tiende a disminuir, a medida que se realiza la alta purificación. Además, en el caso de que el peso molecular del PHA después de la purificación o la productización deba ser un peso molecular alto, se requiere que el PHA tenga un peso molecular adecuadamente alto en la etapa de cultivo antes de la purificación porque el peso molecular disminuye con la aplicación de tratamiento térmico, como el calentamiento y la fusión. Incluso para productos para industrias generales y no como materiales médicos, es necesario un cierto grado de purificación, y se han exigido incluso pesos moleculares más altos para mejorar las propiedades físicas de los PHA después de la purificación. Por lo tanto, se ha demandado un método que pueda proporcionar un PHA de alto peso molecular en comparación con las tecnologías conocidas durante el cultivo.

Un objeto de la presente invención es proporcionar un PHA que contiene 4HB de alto peso molecular que tiene una alta resistencia a la rotura y un alto alargamiento a la rotura.

Como resultado de una investigación diligente para resolver los problemas descritos anteriormente, los inventores de la presente invención encontraron que se puede obtener P(3HB-co-4HB) que tiene varios pesos moleculares incluso mediante cepas de tipo salvaje productoras de PHA que no han experimentado cambios genéticos, y se exhiben excelentes propiedades físicas, en particular, por P(3HB-co-4HB) que tiene un peso molecular promedio en peso de 2.600.000 o superior y en el que una proporción de una unidad de 4-hidroxibutirato es de 14% en moles a 40% en moles respecto a todas las unidades monoméricas. La presente invención se completó en base a los hallazgos descritos anteriormente.

Es decir, según la presente invención, se proporcionan las siguientes invenciones:

(1) Un poliéster que tiene un peso molecular promedio en peso de 2.600.000 o superior determinado por cromatografía de permeación en gel calibrada con estándares de poliestireno, en el que el poliéster comprende al menos una unidad de 3-hidroxibutirato y una unidad de 4-hidroxibutirato como unidades de polimerización, y una proporción de la unidad de 4-hidroxibutirato respecto a todas las unidades de monómero es de 14% en moles a 40% en moles.

(2) El poliéster según (1), en el que el poliéster tiene un peso molecular promedio en número de 300.000 o superior determinado mediante cromatografía de permeación en gel calibrada con estándares de poliestireno.

(3) El poliéster según (1) o (2), en el que las unidades de polimerización consisten en la unidad de 3-hidroxibutirato y la unidad de 4-hidroxibutirato.

(4) El poliéster según cualquiera de (1) a (3), en el que el poliéster es un polímero aleatorio.

(5) Una película que contiene el poliéster según una cualquiera de (1) a (4).

El P(3HB-co-4HB) que tiene un peso molecular promedio en peso de 2.600.000 o superior, en el que una proporción de una unidad de 4-hidroxibutirato es del 14% en moles al 40% en moles con respecto a todas las unidades monoméricas, proporcionado por la presente invención, exhibe excelentes propiedades físicas.

Breve descripción de los dibujos

[Figura 1] La FIG. 1 muestra el espectro ¹H-RMN de PHA del Ejemplo 8.

[Figura 2] La FIG. 2 muestra el espectro ¹³C-RMN de PHA del Ejemplo 8.

[Figura 3] La FIG. 3 muestra el espectro ¹H-RMN de PHA del Ejemplo 9.

[Figura 4] La FIG. 4 muestra el espectro ¹³C-RMN de PHA del Ejemplo 9.

[Figura 5] La FIG. 5 muestra el análisis de la composición de PHA (cromatograma GC-FID) de una célula bacteriana que contiene PHA del Ejemplo 8.

[Figura 6] La FIG. 6 muestra el resultado de la identificación (espectro GC-MS) de cada uno de los picos mostrados en el cromatograma de la FIG. 5.

[Figura 7] La FIG. 7 muestra el resultado de la identificación (espectro GC-MS) de cada uno de los picos mostrados en el cromatograma de la FIG. 5.

5 A continuación se describen realizaciones según la presente invención.

Poliéster

10 El poliéster según la presente invención tiene un peso molecular promedio en peso de 2.600.000 o superior determinado por cromatografía de permeación en gel calibrada con estándares de poliestireno, y contiene al menos una unidad de 3-hidroxibutirato y una unidad de 4-hidroxibutirato como unidades de polimerización, y una proporción de la unidad de 4-hidroxibutirato respecto a todas las unidades monoméricas es del 14% en moles al 40% en moles.

15 Como se describió anteriormente, una de las características del poliéster según la presente invención es el alto peso molecular de 2.600.000 o superior, que es un peso molecular promedio en peso (Mw) determinado por cromatografía de permeación en gel calibrada con estándares de poliestireno. El peso molecular promedio ponderado determinado por cromatografía de permeación en gel calibrada con estándares de poliestireno puede ser 2.700.000 o superior, 2.800.000 o superior, 2.900.000 o superior, 3.000.000 o superior, 3.100.000 o superior, 3.200.000 o superior, 3.300.000 o superior, 3.400.000 o superior, 3.500.000 o superior, 3.600.000 o superior, 3.700.000 o superior, 3.800.000 o superior, 3.900.000 o superior, o 4.000.000 o superior. El límite superior del peso molecular promedio en peso determinado por cromatografía de permeación en gel calibrada con estándares de poliestireno, no está particularmente limitado y normalmente es de 20.000.000 o menos, 10.000.000 o menos, 8.000.000 o menos, 20 7.000.000 o menos, 6.000.000 o menos, o 5.000.000 o menos. Fijando el peso molecular promedio en peso del poliéster para que sea 2.600.000 o superior, se puede producir una película que tenga una alta resistencia a la rotura.

25 Se sabe que P(3HB-co-4HB) es extensible y flexible; sin embargo, en el caso en que el peso molecular promedio en peso sea de 2.600.000 o superior, o deseablemente en el caso de un peso molecular ultraalto, donde el peso molecular promedio en peso sea de 3.000.000 o superior, se encontró que se mejora la resistencia a la rotura mientras la extensibilidad está presente.

30 Para el poliéster según la presente invención, el peso molecular promedio en número (Mn) determinado por cromatografía de permeación en gel calibrada con estándares de poliestireno, es preferiblemente 300.000 o superior. El peso molecular promedio en número determinado por cromatografía de permeación en gel calibrada con estándares de poliestireno puede ser 350.000 o superior, 400.000 o superior, 450.000 o superior, 500.000 o superior, 550.000 o superior, 600.000 o superior, 650.000 o superior, 700.000 o superior, 750.000 o superior, 800.000 o superior, 850.000 o superior, 900.000 o superior, 950.000 o superior, o 1.000.000 o superior. El límite superior del peso molecular promedio en número determinado por cromatografía de permeación en gel calibrada con estándares de poliestireno, no está particularmente limitado y normalmente es de 10.000.000 o menos, y puede ser de 5.000.000 o menos, 400 o menos, 3.000.000 o menos, o 2.000.000 o menos.

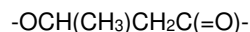
35 La proporción de Mw a Mn (Mw/Mn) no está particularmente limitada y es preferiblemente de 1,0 a 10,0, más preferiblemente de 1,0 a 8,0, aún más preferiblemente de 1,0 a 7,0, aún incluso más preferiblemente de 1,0 a 6,0, aún incluso más preferiblemente de 1,0 a 5,0, e incluso más preferiblemente de 1,0 a 4,0.

La medida del peso molecular promedio en peso por cromatografía de permeación en gel calibrada con estándares de poliestireno puede realizarse por el mismo método descrito en los ejemplos posteriores.

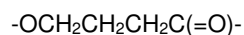
40 El poliéster según la presente invención contiene al menos una unidad de 3-hidroxibutirato y una unidad de 4-hidroxibutirato como unidades de polimerización. Es decir, el poliéster según la presente invención puede ser un poliéster que contenga una unidad de 3-hidroxibutirato y una unidad de 4-hidroxibutirato únicamente, como unidades de polimerización (es decir, las unidades de polimerización consisten en la unidad de 3-hidroxibutirato y la unidad de 4-hidroxibutirato) o puede ser un poliéster que contiene la unidad de 3-hidroxibutirato y la unidad de 4-hidroxibutirato 45 como unidades de polimerización y que además contiene otra unidad de polimerización además de las descritas anteriormente. Los ejemplos de dicha otra unidad de polimerización incluyen lactato (LA), glicolato (GA), 3-hidroxipropionato (3HP), 3-hidroxivalerato (3HV), 5-hidroxivalerato (5HV), 5-hidroxihexanoato (5HH), 6-hidroxihexanoato (6HH), 3-hidroxihexanoato (3HH) e hidroxialcanoato que tiene 7 o más carbonos.

50 En la presente invención, la unidad de 3-hidroxibutirato y la unidad de 4-hidroxibutirato están representadas por las siguientes fórmulas.

Unidad de 3-hidroxibutirato:



Unidad de 4-hidroxibutirato:



Una de las características del poliéster según la presente invención es que la proporción de la unidad 4-hidroxibutirato es del 14% en moles al 40% en moles con respecto a todas las unidades monoméricas.

La proporción de la unidad de 4-hidroxibutirato con respecto a todas las unidades monoméricas puede ser del 15% en moles o superior, 16% en moles o superior, 17% en moles o superior, 18% en moles o superior, 19% en moles o superior, 20% en moles o superior, 20,2% en moles o superior, 20,6% en moles o superior, 21% en moles o superior, 22% en moles o superior, 23% en moles o superior, 24% en moles o superior, 25% en moles o superior, 26% en moles o superior, 27% en moles o superior, o 28% en moles o superior.

La proporción de la unidad de 4-hidroxibutirato con respecto a todas las unidades de monómero puede ser 35% en moles o menos, 34% en moles o menos, 33% en moles o menos, 32% en moles o menos, 31% en moles o menos, 30% en moles o menos, 29,9% en moles o menos, 29,8% en moles o menos, 29% en moles o menos, 28% en moles o menos, 27% en moles o menos, 26% en moles o menos, o 25% en moles o menos.

La proporción de la unidad de 4-hidroxibutirato con respecto a todas las unidades monoméricas es preferiblemente 20,2% en moles o superior, 20,6% en moles o superior, 21% en moles o superior, 22% en moles o superior, 23% en moles o superior, 24% en moles o superior, o 25% en moles o superior, pero 29,9% en moles o menos, 29,8% en moles o menos, 29% en moles o menos, 28% en moles o menos, o 27% en moles o menos. Un ejemplo de la proporción de la unidad de 4-hidroxibutirato con respecto a todas las unidades monoméricas es del 21% en moles al 29% en moles.

En el caso de que el peso molecular promedio en peso del poliéster sea de 2.600.000 o superior, en el rango de 14% en moles a 40% en moles para la proporción de la unidad de 4-hidroxibutirato respecto a todas las unidades monoméricas, el alargamiento a la rotura de la película producida tiende a aumentar a medida que aumenta la proporción de la unidad de 4-hidroxibutirato con respecto a todas las unidades monoméricas. En la presente invención, se puede lograr una alta resistencia a la rotura y un alto alargamiento a la rotura de una manera bien equilibrada combinando el peso molecular promedio en peso del poliéster de 2.600.000 o superior y la proporción de la unidad de 4-hidroxibutirato respecto a todas las unidades monoméricas del 14% en moles al 40% en moles.

La proporción de la unidad de 4-hidroxibutirato con respecto a todas las unidades de monómero se puede medir de acuerdo con el método descrito en los ejemplos posteriores.

El poliéster según la presente invención puede ser cualquiera de polímeros aleatorios, polímeros de bloque, polímeros alternos o polímeros injertados, y es preferiblemente un polímero aleatorio.

Método para producir poliéster

El poliéster según la presente invención se puede producir cultivando microorganismos que tienen capacidad de producción de P(3HB) en presencia de ϵ -caprolactona (también conocida como 6-hexanolactona), 6-hidroxihexanoato que es un producto saponificado de ϵ -caprolactona, o su sal como fuente de carbono.

Como microorganismos que tienen capacidad para producir P(3HB), pueden usarse los microorganismos de los géneros *Cupriavidus*, *Alcaligenes*, *Ralstonia*, *Delftia*, *Comamonas*, *Hydrogenophaga*, *Burkholderia*, *Escherichia*, *Azotobacter*, *Methylobacterium*, *Paracoccus*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Allochrodatum*, *Azorhizobium*, *Bacillus*, *Caulobacter*, *Chromobacterium*, *Ectothiorhodospira*, *Klebsiella*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Rhodobacter*, *Rhodococcus*, *Rhodospirillum*, *Rickettsia*, *Sinorhizobium*, *Sphingomonas*, *Synechocystis*, *Thiococcus*, *Thiocystis*, *Vibrio*, o *Wautersia*. Entre estos, el género *Cupriavidus* es preferible, y *Cupriavidus necator* es más preferido. Por ejemplo, se puede utilizar *Cupriavidus necator* H16 (ATCC17699).

Tenga en cuenta que, con la cepa de tipo salvaje de *Cupriavidus necator* H16, 3HB, 3HV, 4HB, 5HV o similar puede incorporarse adecuadamente en PHA; sin embargo, el uso de bacterias genéticamente modificadas, en las que se ha introducido un gen de PHA sintasa que tiene una especificidad de sustrato diferente, permite la polimerización de otro hidroxilado en el PHA. Por consiguiente, además de la cepa *Cupriavidus necator* H16, se puede usar su cepa genéticamente modificada y, como se describió anteriormente, otras especies de *Cupriavidus*, así como también los géneros de *Alcaligenes*, *Ralstonia*, *Delftia*, *Comamonas*, *Hydrogenophaga*, *Burkholderia*, *Escherichia*, *Azotobacter*, *Methylobacterium*, *Paracoccus*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Allochrodatum*, *Azorhizobium*, *Bacillus*, *Caulobacter*, *Chromobacterium*, *Ectothiorhodospira*, *Klebsiella*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Rhodobacter*, *Rhodococcus*, *Rhodospirillum*, *Rickettsia*, *Sinorhizobium*, *Sphingomonas*, *Synechocystis*, *Thiococcus*, *Thiocystis*, *Vibrio*, y *Wautersia*, es decir, los géneros que tienen capacidad de polimerización de PHA o que están impartidos con la capacidad de polimerización de PHA.

El pH de la solución de cultivo es típicamente de aproximadamente 4 a aproximadamente 10, preferiblemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 8, y más preferiblemente de aproximadamente 5,8 a aproximadamente 7,5.

La temperatura de cultivo es típicamente de 15°C a 45°C, preferiblemente de 20°C a 40°C, y más preferiblemente de 25°C a 38°C.

El método de cultivo puede ser cualquiera de cultivo discontinuo, cultivo discontinuo alimentado o cultivo continuo.

El componente medio no está particularmente limitado siempre que el componente medio sea una sustancia que pueda ser asimilada por los microorganismos a utilizar.

5 Como fuente de carbono, por ejemplo, se pueden usar fuentes de carbono orgánicas, como metanol, etanol, butanol, ácido acético y ácido butírico; fuentes de carbono inorgánico, como el dióxido de carbono; materiales naturales, como extracto de levadura, melaza, peptona y extracto de carne; sacáridos, como arabinosa, glucosa, manosa, fructosa y galactosa; sorbitol, manitol e inositol.

10 Como fuente de nitrógeno, por ejemplo, pueden usarse compuestos inorgánicos de nitrógeno, como amoníaco, sales de amonio (cloruro de amonio, sulfato de amonio, fosfato de amonio) y nitrato; y/o sustancias que contienen nitrógeno orgánico, como urea, licor de maceración de maíz, caseína, peptona, extracto de levadura y extracto de carne.

Los ejemplos del componente inorgánico incluyen sales de calcio, sales de magnesio, sales de potasio, sales de sodio, fosfato, sales de manganeso, sales de zinc, sales de hierro, sales de cobre, sales de molibdeno, sales de cobalto, sales de níquel, sales de cromo, compuestos de boro y compuestos de yodo. Ejemplos más específicos de los mismos incluyen fosfato monopotásico, fosfato dipotásico, fosfato magnésico, sulfato magnésico y cloruro sódico.

15 Los ejemplos de otras fuentes de nutrientes orgánicos incluyen aminoácidos, como glicina, alanina, serina, treonina y prolina; y vitaminas, como vitamina B1, vitamina B12 y vitamina C.

20 Como métodos para producir un PHA que contiene 4HB, hay un método en el que se añade un precursor que se puede convertir en 4HB-CoA a una cepa de tipo salvaje que produce PHA para cultivo y un método que introduce una ruta de alimentación de 4HB-CoA mediante modificación genética. En la presente invención, en el caso en que se emplee un método en el que se añade un precursor que puede ser 4HB-CoA a una cepa de tipo salvaje productora de PHA para cultivo, se prefiere usar ϵ -caprolactona o 6-hidroxihexanoato o sus sales (como 6-hidroxihexanoato de sodio y 6-hidroxihexanoato de potasio), en lugar de la comúnmente conocida 4HB, γ -butirolactona, o dioles de número par y mayor o igual a 4 carbonos.

25 Para la 3HB-CoA, la β -cetotiolasa (PhaA) convierte dos acetil-CoA en acetoacetil-CoA, luego la acetoacetil-CoA reductasa (PhaB) la convierte adicionalmente a 3HB-CoA. La PHA sintasa (PhaC) polimeriza la 3HB-CoA para producir P(3HB). Muchas bacterias que sintetizan PHA formadas a partir de unidades de cadena corta (que tienen de 3 a 5 carbonos) tienen genes phaA, phaB y phaC correspondientes a estos tres tipos de enzimas y tienen la capacidad de sintetizar una P(3HB) a partir de acetil-CoA generadas a partir del metabolismo de fuentes de carbono, como sacáridos, grasas y alcoholes. En dichas bacterias, en presencia de ácido propiónico, se suministra 3HV-CoA mediante
30 reducción por condensación de acetil-CoA y propionil-CoA, por lo que coexisten 3HB-CoA y 3HV-CoA, y se acumula P(3HB-co-3HV). El 3HV-CoA también se obtiene a partir de valerato (ácido valérico) y pentanol y se incorpora al PHA como una unidad de 3HV.

35 Además, en presencia de una sustancia que se convierte en un precursor de 4HB-CoA, como el propio 4HB, γ -butirolactona, 1,4-butanodiol, 1,6-hexanodiol, 1,8-octanodiol o 1,10-decanodiol, se suministra 4HB-CoA, por lo que coexisten 3HB-CoA y 4HB-CoA, y se acumula P(3HB-co-4HB).

Con dioles que tienen un número par y mayor o igual a 6 carbonos, se forma 4HB-CoA al mismo tiempo que se forma acetil-CoA por un sistema de β -oxidación.

40 En una síntesis típica de P(3HB-co-4HB) utilizando, por ejemplo, 4HB, γ -butirolactona, 1,4-butanodiol, 1,6-hexanodiol, 1,8-octanodiol o 1,10-decanodiol (Appl. Microbiol. Biotechnol. (1989), 30, 569-573, y Polymer International Volumen 39, Número 3, páginas 169-174, marzo de 1996), no se obtuvo mucha cantidad de P(3HB-co-4HB) de alto peso molecular, lo que causó problemas para emplearlo industrialmente mientras se aseguraban excelentes propiedades físicas.

45 Cuando se añade ϵ -caprolactona al cultivo, ϵ -caprolactona se somete a la apertura del anillo para formar 6-hidroxihexanoato (6HH), luego se añade CoA para formar 6HH-CoA. La acetil-CoA se elimina mediante un sistema de oxidación β y la 4HB-CoA permanece y se incorpora al PHA para convertirse en una unidad 4HB. Es menos probable que la 6HH-CoA se incorpore al PHA debido a la especificidad de sustrato de la PHA sintasa, y se acumula P(3HB-co-4HB).

4HB-CoA también produce acetil-CoA cuando se somete a β -oxidación.

50 Una reacción en la que un compuesto que contiene un grupo hidroxilo se incorpora a un complejo enzima-S-PHA de la PHA sintasa durante la elongación y rompe un tioéster entre la enzima y la cadena de polímero de PHA, y luego la cadena de polímero de PHA se transfiere desde la enzima a un agente de transferencia de cadena para terminar la polimerización de PHA, se denomina reacción de transferencia de cadena en la polimerización por radicales. Existe la posibilidad de que, dado que el 4HB y los dioles son compuestos que contienen grupos hidroxilo, y la γ -butirolactona también experimenta una apertura de anillo para formar 4HB, estos compuestos que contienen grupos hidroxilo pueden
55 actuar como agentes de transferencia de cadena durante la polimerización de PHA y pueden detener la polimerización

del PHA. En particular, dado que uno o ambos de los dos grupos hidroxilo en los extremos de los dioles pueden estar involucrados en la transferencia de cadena, se cree que los dioles en particular tienden a terminar la polimerización de PHA, lo que hace poco probable que se obtenga un PHA de alto peso molecular.

Cuando la ϵ -caprolactona se somete a la apertura del anillo para formar 6HH, que es un compuesto que contiene un grupo hidroxilo. La 4HB-CoA puede ser un sustrato para la PHA sintasa, pero es menos probable que la 6HH-CoA sea un sustrato. De manera similar, se concibe que sea menos probable que el 6HH actúe como un agente de transferencia de cadena en comparación con el 4HB y, por lo tanto, se puede obtener un PHA de mayor peso molecular cuando se usa ϵ -caprolactona.

La producción de sustancias mediante microorganismos incluye la producción asociada al crecimiento y la producción no asociada al crecimiento.

En la producción de PHA asociada al crecimiento, el PHA se acumula mientras prolifera el componente de la célula bacteriana distinto del PHA. En la producción de PHA asociada con el crecimiento, tanto la síntesis de PHA como la proliferación de células bacterianas utilizan acetil-CoA, y es menos probable que haya exceso de acetil-CoA. Se supone que, durante la producción de PHA asociada al crecimiento, se suprime la generación de hidroxilácido libre debido a la degradación del PHA y, por lo tanto, es menos probable que ocurra una reacción de transferencia de cadena y el peso molecular se vuelve relativamente alto.

En la producción de PHA no asociada con el crecimiento, se produce la acumulación de PHA y aumenta el contenido de PHA después de que se haya detenido la proliferación del componente celular bacteriano. Dado que la proliferación de células bacterianas se ha detenido, el exceso de acetil-CoA se utiliza para la producción de PHA. Durante la producción de PHA no asociada con el crecimiento, parece que el componente tomado temporalmente en forma de PHA experimenta una nueva diferenciación, y el hidroxilácido libre se descarga fuera de la célula bacteriana. Se supone que, en el caso en que la fuente de nitrógeno se agota en la última etapa del cultivo, se produce una transición de la producción asociada al crecimiento a la producción no asociada al crecimiento, se producen con frecuencia reacciones de transferencia en cadena y la síntesis y la degradación tienden a ocurrir al mismo tiempo (condiciones en las que el peso molecular disminuye fácilmente).

En la presente invención, se encontró que, en el caso en que el PHA se acumula de forma asociada al crecimiento, se acumula predominantemente un PHA de alto peso molecular en comparación con el caso en el que el PHA se acumula de forma no asociada al crecimiento bajo limitación de nutrientes. Es decir, en la producción de poliéster según la presente invención, a diferencia de la producción de PHA no asociada al crecimiento debida a nutrientes limitados, en la que se separan la proliferación de células bacterianas y la acumulación de PHA, la producción de PHA asociada al crecimiento, en la que se prefiere que la proliferación de las células bacterianas y la acumulación del PHA se producen simultáneamente.

A partir de la solución de cultivo obtenida mediante el cultivo de acuerdo con el método de la presente invención, se pueden obtener células bacterianas secas separando y recogiendo las células bacterianas mediante un medio típico de separación sólido-líquido, como filtración y separación centrífuga, luego lavando y secando las células bacterianas. El poliéster según la presente invención se puede recoger mediante un método común, método que comprende extraer un poliéster producido a partir de células bacterianas secas con un disolvente orgánico como cloroformo, añadir un disolvente pobre como hexano a este líquido extraído para precipitar el poliéster, y recoger el poliéster según la presente invención.

Película

Según la presente invención, se proporciona además una película que contiene el poliéster según la presente invención descrito anteriormente.

El método para producir la película según la presente invención no está particularmente limitado, y la película se puede producir formando una película a través de un método común, como un método de moldeo por disolvente o un método de moldeo por extrusión en estado fundido.

La resistencia a la rotura de la película según la presente invención es preferiblemente 18 N/mm² o superior, o puede ser 19 N/mm² o superior, 20 N/mm² o superior, 21 N/mm² o superior, 22 N/mm² o superior, 23 N/mm² o superior, 24 N/mm² o superior, 25 N/mm² o superior, 26 N/mm² o superior, 27 N/mm² o superior, 28 N/mm² o superior, 29 N/mm² o superior, o 30 N/mm² o superior. El límite superior de la resistencia a la rotura no está particularmente limitado y normalmente es 100 N/mm² o menos, o 50 N/mm² o menos.

La resistencia a la rotura se mide de acuerdo con las normas ISO 527-1 y JIS K 7161.

El alargamiento a la rotura de la película según la presente invención es preferiblemente 300% o superior, o puede ser 400% o superior, 460% o superior, 470% o superior, 480% o superior, 490% o superior, o 500% o superior. El límite superior del alargamiento a la rotura no está particularmente limitado y normalmente es del 1000% o menos, o puede ser 900% o menos, 800% o menos, o 700% o menos.

El alargamiento a la rotura se mide de acuerdo con las normas ISO 527-1 y JIS K 7161.

El módulo de elasticidad de la película según la presente invención es preferiblemente 240 N/mm² o superior o puede ser 250 N/mm² o superior, 270 N/mm² o superior, 300 N/mm² o superior, 350 N/mm² o superior, 400 N/mm² o superior, 450 N/mm² o superior, o 500 N/mm² o superior. El límite superior del módulo de elasticidad no está particularmente limitado y normalmente es de 1000 N/mm² o menos o puede ser 900 N/mm² o menos, o 800 N/mm² o menos.

El módulo de elasticidad se mide de acuerdo con las normas ISO 527-1 y JIS K 7161.

En el caso en que el peso molecular promedio en peso del poliéster sea de 2.600.000 o superior, el módulo de elasticidad tiende a verse afectado por la proporción de la unidad de 4-hidroxibutirato con respecto a todas las unidades monoméricas. Es decir, en el rango de 14% en moles a 40% en moles de la proporción de la unidad de 4-hidroxibutirato con respecto a todas las unidades de monómero, el módulo de elasticidad de la película producida tiende a disminuir a medida que se incrementa la proporción de la unidad de 4-hidroxibutirato respecto a todas las unidades de monómero.

La película que tiene las propiedades físicas descritas anteriormente se puede obtener formando una película del poliéster proporcionado por la presente invención, "el poliéster tiene un peso molecular promedio en peso de 2.600.000 o superior determinado por cromatografía de permeación en gel calibrada con estándares de poliestireno, y que contiene al menos al menos una unidad de 3-hidroxibutirato y una unidad de 4-hidroxibutirato como unidades de polimerización, en donde una proporción de la unidad de 4-hidroxibutirato con respecto a todas las unidades monoméricas es de 14% en moles a 40% en moles".

En el caso en que se produzca la película según la presente invención, la película se forma únicamente con el poliéster proporcionado por la presente invención, sin mezclar con un copolímero que contiene acetato de vinilo y/o pentaeritritol. Es decir, la película de una realización según la presente invención puede ser una película que contenga el poliéster proporcionado por la presente invención, sin copolímero que contenga acetato de vinilo y sin pentaeritritol.

La película según la presente invención tiene excelentes propiedades físicas descritas anteriormente, está formada a partir de P(3HB-co-4HB) que tiene excelente biodegradabilidad y biocompatibilidad, y es útil para, por ejemplo, aparatos médicos, material de envasado para alimentos y otros, láminas de plástico para agricultura, maceteros para siembra y láminas para construcción e ingeniería.

La presente invención se describirá más específicamente a continuación utilizando ejemplos, pero la presente invención no se limita a los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Producción de polímero (cultivo en frasco)

Ejemplo 1

El PHA se produjo utilizando *Cupriavidus necator* H16 (ATCC17699).

Un medio obtenido mediante la adición de 14,24 g/L de fructosa en un medio esterilizado 1 formado a partir de 2,72 g/L de KH₂PO₄, 4,26 g/L de Na₂HPO₄, 0,3 g/L de NaHCO₃, 2 g/L de (NH₄)₂SO₄, 0,2 g/L de MgSO₄·7H₂O, 0,2 g/L de un extracto de levadura y 3,5 mL de una solución mineral descrita a continuación se sometió a cultivo en agitación en un tubo de ensayo a 30°C durante 24 horas para obtener una solución de pre-precultivo.

Solución mineral: se disuelven en agua 6 g/L de FeC₆H₅O₇·xH₂O, 2 g/L de ZnSO₄·7H₂O, 0,1 g/L de CuSO₄·5H₂O, 1 g/L de MnCl₂·4H₂O, 0,1 g/L de KI, 0,1 g/L de (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O, 0,1 g/L de CoCl₂·6H₂O, 0,2 g/L de H₃BO₃, 5 g/L de NaCl y 4 g/L de CaCl₂·2H₂O.

En un matraz Erlenmeyer de 500 mL de capacidad volumétrica que contiene 100 mL de un medio obtenido añadiendo 14,24 g/L de fructosa al medio 1 citado anteriormente o un medio obtenido añadiendo 8,86 g/L de fructosa y 5,38 g/L de ε-caprolactona, se inoculó 1 mL de la solución de pre-precultivo y se cultivó a 30°C y 150 rpm durante 48 horas a 96 horas para obtener un cultivo madre (solución de precultivo).

En un fermentador de jarra de 3 L, se prepararon 2 L de un medio cambiando la cantidad de (NH₄)₂SO₄ del medio 1 mencionado anteriormente para que fuera 12,5 g/L. Después de esterilizar el medio, se inocularon 100 mL del cultivo madre en el medio y luego se inició asepticamente el proceso de alimentación discontinua alimentada usando el 42% en masa de fructosa y ε-caprolactona a través de un filtro esterilizante (PTFE de 0,2 μm de poro). La velocidad de alimentación y la proporción de alimentación de la fuente de carbono se pueden configurar de manera apropiada. Para evitar la terminación de la proliferación de células bacterianas provocada por una cantidad excesiva de fuente de carbono residual que no fue utilizada por las células bacterianas en el recipiente de cultivo, el cultivo se inició con una velocidad de alimentación del 42% en masa de fructosa de aproximadamente 1 a 2 g/h (0,5 a 1 g/h·L) y a una velocidad de alimentación de ε-caprolactona de aproximadamente 0,2 a 0,5 g/h (0,1 a 0,25 g/h·L), que eran caudales bajos, y estas velocidades de alimentación se aumentaron gradualmente o de forma continua a medida que proliferaban las células bacterianas. El volumen de ventilación se controló a 0,2 a 0,3 L/min, la velocidad de agitación se controló a

500 a 700 rpm, la temperatura del cultivo se controló a 36°C y el límite inferior del pH del cultivo se controló a 6,0. Se usó agua con amoníaco al 12,5% como álcali de ajuste del pH. La proporción de ε-caprolactona a fructosa fue de aproximadamente 0,5. El cultivo se terminó a las 100 horas después del inicio del cultivo.

5 Después del cultivo, las células bacterianas se recogieron por separación centrífuga, se congelaron a -20°C y luego se sometieron a liofilización.

10 El método de extracción y purificación del PHA de las células bacterianas se realizó como se describe a continuación. En un matraz Erlenmeyer de vidrio con tapa roscada, se suspendieron aproximadamente de 4 a 10 g de las células bacterianas liofilizadas en 400 mL de cloroformo y se sometieron a extracción a 30°C durante 24 a 48 horas. La solución viscosa obtenida se filtró con un papel de filtro para eliminar el residuo de células bacterianas. La solución transparente obtenida se concentró a aproximadamente 100 a 200 mL mediante un evaporador, y el PHA se precipitó con una cantidad de hexano 5 veces mayor, que era un mal disolvente. Los precipitados blancos obtenidos se lavaron con etanol y luego se secaron al vacío para obtener PHA purificado.

Ejemplo 2

15 Se realizó el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1, excepto que se cambió la temperatura de cultivo en el cultivo del frasco a 34°C y se cambió el tiempo de cultivo a 112,5 horas.

Ejemplo 3

Se realizó el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1, excepto que se cambió la temperatura de cultivo en el cultivo del frasco a 30°C, usando un medio en el que la cantidad de (NH₄)₂SO₄ se cambió a 15 g/L, y cambiando el tiempo de cultivo a 149 horas.

20 Ejemplo 4

Se realizó el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1 excepto que se utilizó un medio en el que la cantidad de (NH₄)₂SO₄ en el cultivo del frasco se cambió a 10 g/L.

Ejemplo 5

25 Se realizó el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1 excepto que se utilizó un medio en el que la cantidad de (NH₄)₂SO₄ en el frasco se cambió el cultivo a 15 g/L y se cambió el tiempo de cultivo a 184,8 horas.

Ejemplo 6

Se realizó el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1, excepto que se estableció la proporción de ε-caprolactona a fructosa en el cultivo en frasco a 0,7 y se cambió el tiempo de cultivo a 113,5 horas.

Ejemplo 7

30 Se realizó el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1, excepto que se cambió el tiempo de cultivo en el cultivo en frasco a 112 horas.

Ejemplo 8

35 Se realizó el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1 excepto que se utilizó un medio en el que la cantidad de (NH₄)₂SO₄ en el cultivo del frasco se cambió a 7,5 g/L, usando una solución de NaOH 4 N como álcali de ajuste de pH, y cambiando el tiempo de cultivo a 122,5 horas.

Ejemplo 9

Se realizó el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1, excepto que se cambió la temperatura de cultivo en el cultivo del frasco a 37°C, utilizando un medio en el que la cantidad de (NH₄)₂SO₄ se cambió a 7,5 g/L, usando una solución de NaOH 4N como álcali de ajuste de pH, y cambiando el tiempo de cultivo a 102,5 horas.

40 Ejemplo 10

Se realizó el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1, excepto que se estableció la proporción de ε-caprolactona a fructosa en el cultivo en frasco a 0,4 y se cambió el tiempo de cultivo a 94,5 horas.

Ejemplo 11

45 Se realizó el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1, excepto que se cambió la temperatura de cultivo en el cultivo en frasco a 37°C.

Ejemplo 12

Se realizó el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1, excepto que se cambió la temperatura de cultivo en el cultivo del frasco a 38°C.

Ejemplo 13

- 5 Se realizó el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1, excepto que se cambió la temperatura de cultivo en el frasco de cultivo a 38°C, utilizando un medio en el que la cantidad de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ se cambió a 7,5 g/L, y cambiando el tiempo de cultivo a 114,3 horas.

Ejemplo 14 como ejemplo de referencia

- 10 Se realizó el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1, excepto que se cambió la temperatura de cultivo en el frasco de cultivo a 38°C, utilizando un medio en el que la cantidad de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ se cambió a 7,5 g/L, usando una solución de NaOH 4N como álcali de ajuste de pH, y cambiando el tiempo de cultivo a 114,3 horas.

Ejemplo 15 como ejemplo de referencia

- 15 Se realizó el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1 excepto que se utilizó un medio en el que la cantidad de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en el cultivo del frasco se cambió a 7,5 g/L, añadiendo 25 g/L de acetato de sodio a la solución de fructosa al 42% en masa, y cambiando el tiempo de cultivo a 122,5 horas.

Ejemplo 16 como ejemplo de referencia

Se realizó el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1 excepto que se utilizó un medio en el que la cantidad de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en el cultivo del frasco se cambió a 17,5 g/L, usando γ -butirolactona en lugar de ϵ -caprolactona, y cambiando el tiempo de cultivo a 185,8 horas.

20 Ejemplo 17

En un matraz Erlenmeyer de 500 mL de capacidad volumétrica que contiene 125 mL de un medio obtenido cambiando la cantidad de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ del medio 1 a 2,5 g/L, y añadiendo al medio 8,86 g/L de fructosa y 5,38 g/L de ϵ -caprolactona al que se añadieron 3 g/L de NaCl, se inoculó 1 mL de la solución de precultivo en el ensayo el cultivo en tubo de ensayo y se cultivó a 30°C y 150 rpm durante 96 horas. La recolección de las células bacterianas y la extracción y purificación del PHA se realizaron de la misma manera que en el Ejemplo 1.

25 Ejemplo Comparativo 1

Se realizó el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1, excepto que se cambió la temperatura de cultivo en el cultivo del frasco a 30°C, usando un medio en el que la cantidad de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ se cambió a 7,5 g/L, y cambiando el tiempo de cultivo a 136,5 horas.

30 Ejemplo Comparativo 2

Se realizó el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1 excepto que se cambió la temperatura de cultivo en el cultivo del frasco a 36°C, utilizando un medio en el que la cantidad de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ se cambió a 7,5 g/L, usando γ -butirolactona en lugar de ϵ -caprolactona, usando una solución de NaOH 2 N como álcali de ajuste de pH, y cambiando el tiempo de cultivo a 108 horas. El PHA extraído se almacenó en condiciones deshumidificadas y desoxigenadas (envase RP, disponible de Mitsubishi Gas Chemical Company, Inc.) a 25°C durante 6 meses.

35 Ejemplo Comparativo 3

La muestra de PHA producida mediante el cultivo y la extracción en el Ejemplo Comparativo 2 se almacenó en una humedad del 100% a 40°C durante un mes.

Ejemplo Comparativo 4

- 40 La muestra de PHA producida mediante el cultivo y la extracción en el Ejemplo Comparativo 2 se almacenó en una humedad del 100% a 25°C durante 6 meses.

Ejemplo Comparativo 5

- 45 La muestra de PHA producida mediante el cultivo y la extracción en el Ejemplo Comparativo 2 se almacenó en condiciones deshumidificadas y desoxigenadas (envase RP, disponible de Mitsubishi Gas Chemical Company, Inc.) a 60°C durante 3 meses.

Ejemplo Comparativo 6

La muestra de PHA producida mediante el cultivo y la extracción en el Ejemplo comparativo 2 se almacenó en condiciones deshumidificadas y desoxigenadas (envase RP, disponible de Mitsubishi Gas Chemical Company, Inc.) a 60°C durante 6 meses.

5 Ejemplo Comparativo 7

La muestra de PHA producida mediante el cultivo y la extracción en el Ejemplo Comparativo 2 se almacenó en una humedad del 100% a 40°C durante 6 meses.

Ejemplo Comparativo 8

10 La muestra de PHA producida mediante el cultivo y la extracción en el Ejemplo Comparativo 2 se almacenó en una humedad del 100% a 60°C durante un mes.

Análisis del polímero

1H-RMN y 13C-RMN

15 El análisis de composición y el análisis de enlace del PHA purificado producido en cada uno de los ejemplos y ejemplos comparativos se determinaron utilizando un espectrómetro de resonancia magnética nuclear (ECA 500, JASCO Corporation). El PHA purificado se disolvió en CDCl₃ en la concentración de 1,5% en masa y se utilizó como muestra de medición. El espectro de ¹H-RMN se midió a 500 MHz, y el espectro de ¹³C-RMN se midió a 125 MHz a temperatura ambiente.

La proporción de 4HB medida por RMN para el PHA en cada uno de los ejemplos o ejemplos comparativos se muestra en la Tabla 3 posterior.

20 Los espectros de ¹H-RMN y ¹³C-RMN de PHA en el Ejemplo 8 se muestran en la FIG. 1 y la FIG. 2.

Los espectros de ¹H-RMN y ¹³C-RMN de PHA en el Ejemplo 9 se muestran en la FIG. 3 y la FIG. 4.

El resultado del análisis de composición del PHA basado en el resultado del análisis de ¹H-RMN se muestra en la Tabla 1 posterior.

El resultado del análisis de enlace basado en el resultado del análisis de ¹³C-RMN se muestra en la Tabla 2 posterior.

25 Los polímeros producidos en los ejemplos fueron polímeros aleatorios.

Tabla 1

	3HB (5,23-5,41)	4HB (4,09-4,15)x0,5	Total	% de 3HB en moles	% de 4HB en moles
Ejemplo 8	1,18	0,500	1,68	70,2	29,8
Ejemplo 9	2,49	0,500	2,99	83,3	16,7

Tabla 2

	Valor en la literatura de desplazamiento químico (ppm)/valor medido (ppm)/estructura de enlace/área del pico de ¹³ C-RMN (%)									% de 4HB en moles
	169,15	169,25	170,00	170,08	171,85	171,88	171,92	172,62	172,67	
	169,12	169,21	169,97	170,06	171,81	171,84	171,89	172,60	172,64	
	3-3-3	4-3-3	3-3-4	4-3-4	X-4-3			3-4-4	4-4-4	
Ejemplo 8	43,3	13,1	8,3	6,0	6,8	5,4	3,3	3,4	10,6	29,8
Ejemplo 9	61,1	11,9	9,2	3,7	7,5	5,0	0,0	1,3	0,4	16,7

30 Análisis de la composición de PHA (método GC)

El análisis de la composición del PHA contenido en la célula bacteriana por el método GC se realizó como se describe a continuación. Aproximadamente 10 mg de las células bacterianas secas obtenidas se pesaron en un tubo de ensayo con tapa rosca, se mezclaron con 2 mL de cloroformo y 2 mL de una solución mixta de patrón interno de metanol y ácido sulfúrico (patrón interno: ácido benzoico 0,5 g/L; ácido sulfúrico 3,7% en masa), sometido a un tratamiento térmico a 121°C durante 90 minutos, y luego se enfriaron a temperatura ambiente para someter el PHA a esterificación con metilo. Una vez finalizada la reacción, se añadió 1 mL de agua pura. Después de agitación vigorosa y separación centrífuga, se obtuvo una fase de disolvente orgánico. Esta fase de disolvente orgánico se deshidrató con sulfato de sodio y luego se analizó por cromatografía de gases para calcular el contenido del componente PHA. Las condiciones para GC son las que se muestran a continuación.

35

Condiciones de análisis de cromatografía de gases

Instrumento: Shimadzu GC-2025

Columna capilar: DB-1 (0,25 mm (di) × 60 m; espesor de película: 1 µm)

Gas portador: He (3,23 mL/min)

5 Temperatura de la columna: 125°C 6,5 min - velocidad 25°C/min - 260°C

Caudal de composición: 30 ml/min

Caudal de H₂: 40 mL/min

Caudal de aire: 400 mL/min

Inyección: 250°C

10 Detector: FID (260°C)

División: 1:20

Cantidad de inyección: 1 µL

Tiempo de análisis: 21,5 min

Un cromatograma típico de GC-FID (PHA producido en el Ejemplo 8) se muestra en la FIG. 5.

15 Se produce una pluralidad de picos derivados de 3HB y 4HB en el caso en que el PHA que contiene 4HB o las células bacterianas secas que contienen el PHA se sometieron a esterificación con metilo y luego a análisis GC-FID usando columnas capilares de alta resolución. Por tanto, la identificación de cada uno de los picos se realizó utilizando GC-MS (GCMS-QP2010 Plus, disponible de Shimadzu Corporation). Las condiciones para GC fueron las mismas que las condiciones para GC-FID. El resultado de la identificación de cada uno de los picos se muestra en la FIG. 6 y la FIG. 7.

Medición del peso molecular de PHA (método de cromatografía de permeación en gel (GPC))

La medición del peso molecular de PHA se realizó mediante el método de cromatografía de permeación en gel como se describe a continuación. El resultado de la medición del peso molecular del PHA en cada uno de los ejemplos o ejemplos comparativos se muestra en la Tabla 3 posterior.

25 Al PHA purificado se le añadió cloroformo en tal cantidad que la concentración alcanza aproximadamente 0,5 mg/mL, y se disolvió a 60°C durante 4 horas y luego se enfrió a temperatura ambiente. Se obtuvo una muestra para la medición después de filtrar y eliminar las sustancias insolubles utilizando un filtro de PTFE con un diámetro de poro de 0,2 µm. Las condiciones para GPC son las que se muestran a continuación.

Instrumento: Sistema HPLC Prominence, disponible de Shimadzu Corporation

30 Columna: Shodex K-806L (dos columnas en serie), disponible en Showa Denko K.K.

Temperatura de la columna: 40°C

Fase móvil: Cloroformo (1 mL/min)

Detector: RI (40°C)

Estándares: Estándares de peso molecular de poliestireno Shodex (6870000 a 1270)

35 Cantidad de inyección: 60 µL

Tiempo de análisis: 30 minutos

Producción de película de PHA (método de moldeo con disolventes)]

40 En 200 ml de cloroformo, se disolvieron 5 g de PHA (PHA en cada uno de los ejemplos o ejemplos comparativos) y se vertieron en un recipiente de vidrio de fondo cuadrado de 18 x 18 cm. El cloroformo se vaporizó gradualmente para producir una película moldeada con disolvente. Se produjo una película que tenía un espesor de aproximadamente 0,1 a 0,2 mm. Después de la vaporización del cloroformo, la película se desprendió del recipiente y se secó al vacío durante 2 semanas o más, y luego se usó en un ensayo de tracción.

Método de ensayo de tracción

La película moldeada con disolvente se perforó en una forma de JIS K 7127 tipo 5 para formar una forma de mancuerna para probar y medir la resistencia a la rotura, el alargamiento a la rotura y el módulo de elasticidad de la película en una condición a una temperatura de 23°C y una velocidad de ensayo de 100 mm/min usando AUTOGRAPH AGS-X (disponible de Shimadzu Corporation). Los resultados de la medición se muestran en la Tabla 3 posterior.

Tabla 3

	Proporción de 4HB (% en moles)	Peso molecular (x 10 ⁶)			Ensayo de tracción de la película		
		Mw	Mn	Mw/Mn	Resistencia a la rotura (N/mm ²)	Alargamiento a la rotura (%)	Módulo de elasticidad (N/mm ²)
Ejemplo 1	20,2	4,21	1,14	3,7	30,4	515	631
Ejemplo 2	20,0	4,14	1,02	4,1	28,9	486	631
Ejemplo 3	16,0	4,04	0,66	6,1	31,2	410	977
Ejemplo 4	21,2	3,86	1,04	3,7	27,4	511	570
Ejemplo 5	22,4	3,81	0,55	6,9	26,8	515	511
Ejemplo 6	22,4	3,63	0,79	4,6	27,2	507	546
Ejemplo 7	22,7	3,25	0,54	6,0	26,7	594	412
Ejemplo 8	29,8	3,20	0,96	3,3	24,5	637	297
Ejemplo 9	16,7	3,19	0,88	3,6	31,6	473	752
Ejemplo 10	20,1	3,12	0,44	7,0	23,0	524	479
Ejemplo 11	22,8	2,91	0,51	5,7	25,0	602	371
Ejemplo 12	24,6	2,80	0,73	3,9	21,3	587	307
Ejemplo 13	21,3	2,64	0,39	6,8	21,1	473	479
Ejemplo 14*	23,3	2,14	0,35	6,1	19,9	614	244
Ejemplo 15*	21,3	2,04	0,30	6,9	21,1	544	312
Ejemplo 16*	28,2	1,96	0,49	4,0	19,7	538	259
Ejemplo 17	20,6	7,73	3,43	2,3	26,5	580	360
Ejemplo Comparativo 1	13,2	3,06	0,68	4,5	17,3	247	1156
Ejemplo comparativo 2	17,9	0,75	0,32	2,3	13,0	434	230
Ejemplo Comparativo 3	17,9	0,72	0,32	2,2	11,0	429	140
Ejemplo comparativo 4	17,9	0,60	0,26	2,3	12,7	457	205
Ejemplo Comparativo 5	17,9	0,49	0,18	2,7	10,2	386	219
Ejemplo Comparativo 6	17,9	0,26	0,10	2,5	6,2	211	237
Ejemplo comparativo 7	17,9	0,15	0,06	2,6	5,0	12	242
Ejemplo comparativo 8	17,9	0,14	0,05	2,6	4,8	12	248

*Ejemplo de referencia no conforme a la presente invención

Producción de polímero (cultivo en matraz)

Ejemplos 18 a 31

- 10 Cada PHA se produjo utilizando *Cupriavidus necator* H16 (ATCC17699).

Un medio obtenido mediante la adición de 14,24 g/L de fructosa en un medio esterilizado 1 formado a partir de 2,72 g/L de KH₂PO₄, 4,26 g/L de Na₂HPO₄, 0,3 g/L de NaHCO₃, 2 g/L de (NH₄)₂SO₄, 0,2 g/L de MgSO₄·7H₂O, 0,2 g/L de un extracto de levadura y 3,5 mL de la misma solución mineral que la del ejemplo 1 se cultivó en un tubo de ensayo a 30°C durante 24 horas para obtener una solución de precultivo.

- 15 En cada matraz Erlenmeyer de 500 mL de capacidad volumétrica que contiene 100 mL de un medio obtenido añadiendo al medio 1 8,86 g/L de fructosa y 5,38 g/L de ε-caprolactona (ejemplos 21 a 33; sin embargo, la concentración de sulfato de amonio estaba en la cantidad que se muestra en la tabla) o un medio obtenido añadiendo 8,86 g/L de fructosa y 6,46 g/L de ε-caprolactona (Ejemplo 34; sin embargo, la concentración de sulfato de amonio estaba en la cantidad que se muestra en la tabla), se inoculó 1 mL del medio de precultivo y se cultivó a 30°C y 150 rpm durante el período de tiempo que se muestra en la tabla. El pH antes del inicio del cultivo fue aproximadamente de 6,8 a 7,5. Después de la terminación del cultivo, las células bacterianas se recogieron por separación centrífuga y se liofilizaron, y se midió el peso de las células bacterianas secas. Además, el contenido de PHA y la composición determinados por análisis GC después de la esterificación con metilo y el resultado de la medición del peso molecular por cromatografía de permeación en gel (método GPC) también se muestran en la Tabla 4 posterior. El análisis de la composición de PHA por el método GC se realizó de la misma manera que en los ejemplos 1 a 17 y los ejemplos comparativos 1 a 8.
- 20
- 25

Medición del peso molecular de PHA (método GPC)

La medición del peso molecular de PHA se realizó por el método de cromatografía de permeación en gel de la misma manera que en los ejemplos 1 a 17 y los ejemplos comparativos 1 a 8 excepto que se usaron células bacterianas liofilizadas en lugar de PHA purificado.

Tabla 4

	Cultivo	Fuente de carbono		Fuente de nitrógeno	Añadido	Peso de células bacterianas secas	componente de la célula bacteriana	PHA	3HB	4HB	proporción de 4HB	Peso molecular		
		ECL	Fructosa									x10 ⁶		
	Tiempo	g/L	g/L	g/L	g/L	g/L	g/L	% en peso	% en peso	% en peso	% en moles	Mn	Mw	MW/Mn
Ejemplo 18	H													
Ejemplo 19	96	5,38	8,86	2,0		5,01	3,43	31,5	26,6	4,9	15,6	1,16	5,37	4,6
Ejemplo 20	96	5,38	8,86	4,0		5,09	3,44	32,4	27,2	5,2	16,2	1,59	5,73	3,6
Ejemplo 21	96	5,38	8,86	7,5		4,93	3,32	32,7	26,7	6,0	18,4	1,93	5,69	3,0
Ejemplo 22	120	5,38	8,86	10,0		4,29	2,63	38,7	31,4	7,3	18,9	2,32	5,75	2,5
Ejemplo 23	120	5,38	8,86	12,5		4,93	2,93	40,6	30,8	9,9	24,3	2,29	5,83	2,5
Ejemplo 24	144	5,38	8,86	15,0		3,44	2,02	41,3	31,1	10,2	24,7	3,24	6,33	2,0
Ejemplo 25	96	5,38	8,86	17,5		4,37	2,64	39,6	29,6	10,0	25,2	2,22	5,46	2,5
Ejemplo 26	96	5,38	8,86	2,0	0,0	5,21	3,12	40,2	34,0	6,2	15,4	1,33	4,38	3,3
Ejemplo 27	96	5,38	8,86	2,0	2,5	5,04	3,14	37,6	30,5	7,0	18,7	1,78	4,85	2,7
Ejemplo 28	96	5,38	8,86	2,0	5,0	4,05	2,53	37,4	28,9	8,5	22,6	1,61	5,33	3,3
Ejemplo 29	144	5,38	8,86	2,0	7,5	2,63	1,69	35,8	24,8	11,0	30,8	2,80	6,06	2,2
Ejemplo 30	96	5,38	8,86	2,0	10,0	3,90	2,31	40,9	28,6	12,3	30,1	2,42	5,69	2,3
Ejemplo 31	192	6,46	7,78	2,0		4,48	2,60	40,4	33,0	7,4	18,3	2,74	6,61	2,4
						3,97	2,09	47,3	34,9	12,4	26,3	3,01	6,50	2,2

REIVINDICACIONES

1. Un poliéster que tiene un peso molecular promedio en peso de 2.600.000 o superior determinado por cromatografía de permeación en gel calibrada con estándares de poliestireno, en el que el poliéster comprende al menos una unidad de 3-hidroxibutirato y una unidad de 4-hidroxibutirato como unidades de polimerización, y una proporción de la unidad de 4-hidroxibutirato respecto a todas las unidades de monómero es de 14% en moles a 40% en moles.
2. El poliéster según la reivindicación 1, en el que el poliéster tiene un peso molecular promedio en número de 300.000 o superior determinado mediante cromatografía de permeación en gel calibrada con estándares de poliestireno.
3. El poliéster según la reivindicación 1 o 2, en el que las unidades de polimerización consisten en la unidad de 3-hidroxibutirato y la unidad de 4-hidroxibutirato.
4. El poliéster según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el poliéster es un polímero aleatorio.
5. Una película que contiene el poliéster descrito según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

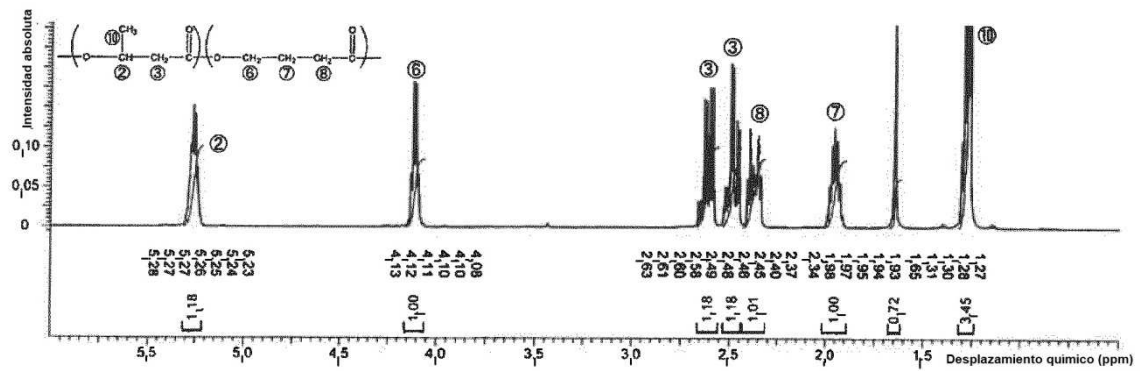


FIG. 1

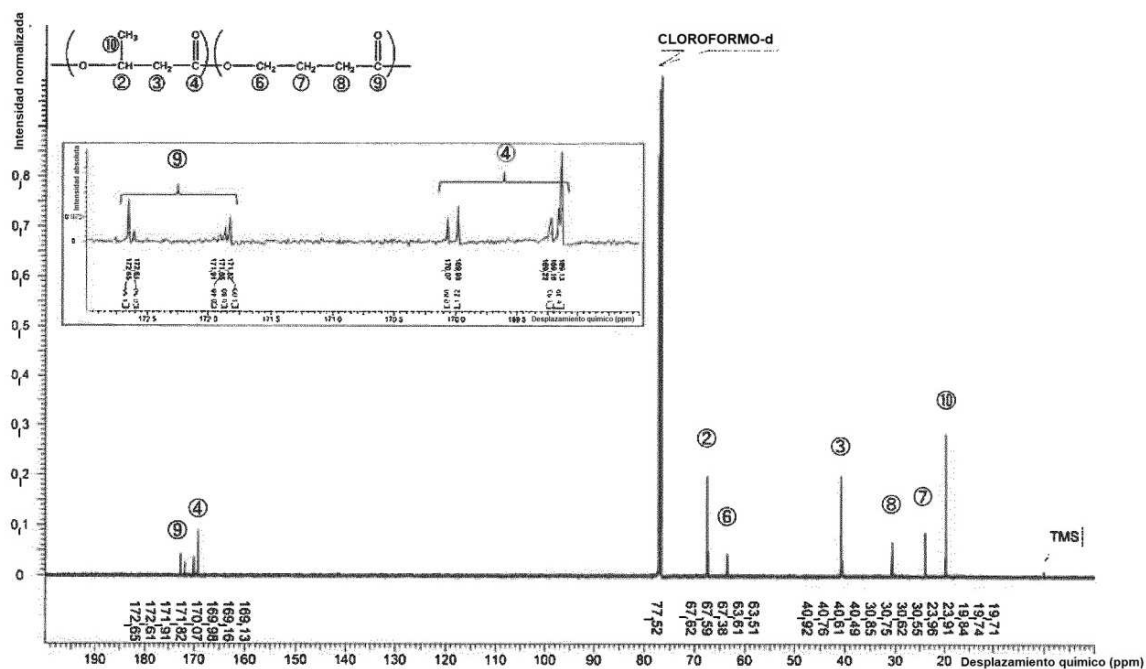


FIG. 2

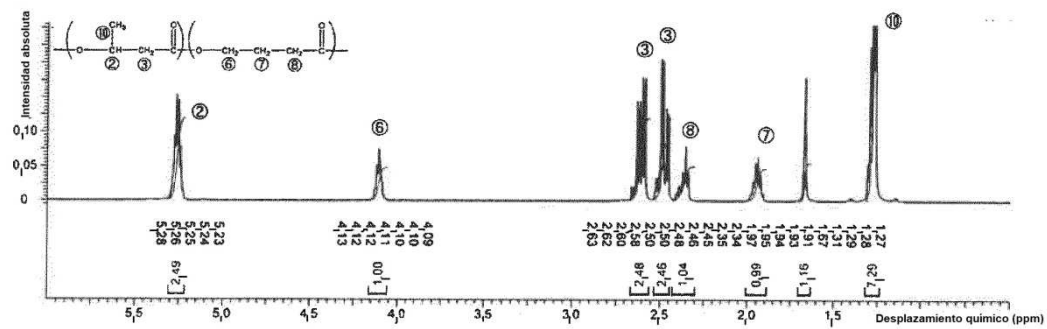


FIG. 3

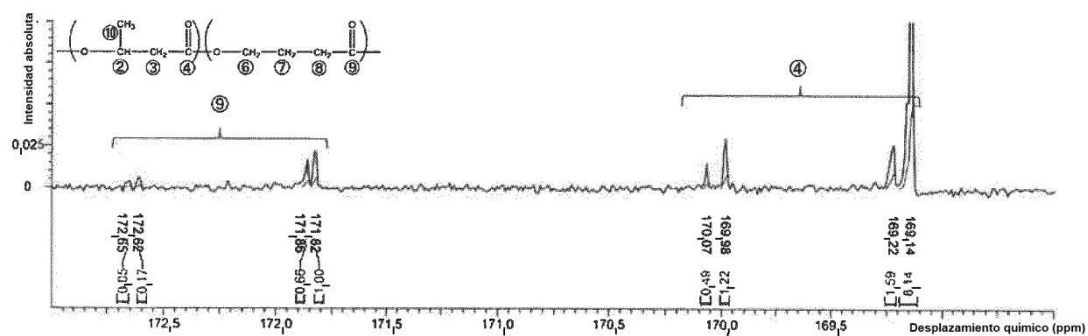
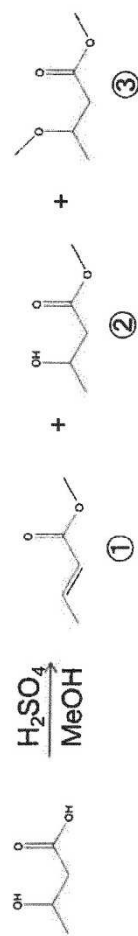
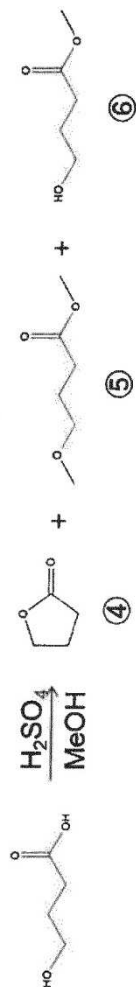


FIG. 4

LOS PICOS 1, 2 Y 3 SON RESPECTIVAMENTE CROTONATO DE METILO, 3-HIDROXIBUTANOATO DE METILO Y 3-METOXIBUTANOATO DE METILO, QUE SE DERIVAN DE 3HB



LOS PICOS 4, 5 Y 6 SON RESPECTIVAMENTE γ -BUTIROLACTONA, 4-METOXIBUTANOATO DE METILO, Y 4-HIDROXIBUTANOATO DE METILO, QUE SE DERIVAN DE 4HB



CRONATOGRAMA DE GASES DE LA MUESTRA DE CÉLULAS BACTERIANAS CULTIVADAS DESPUÉS DE LA ESTERIFICACIÓN CON METILO

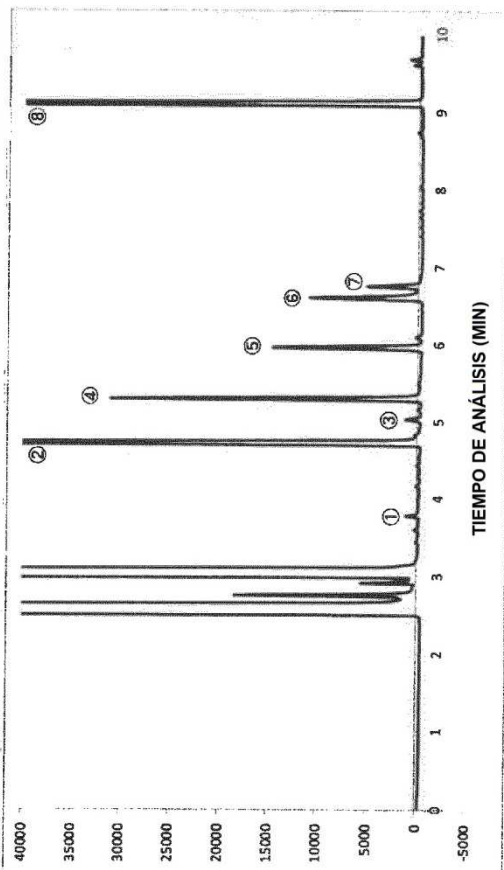
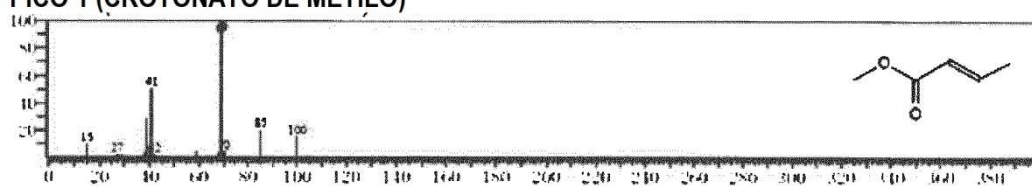
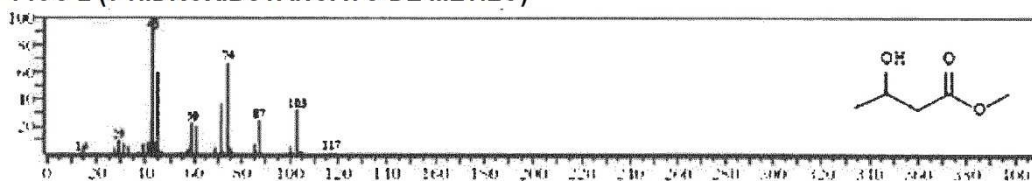


FIG. 5

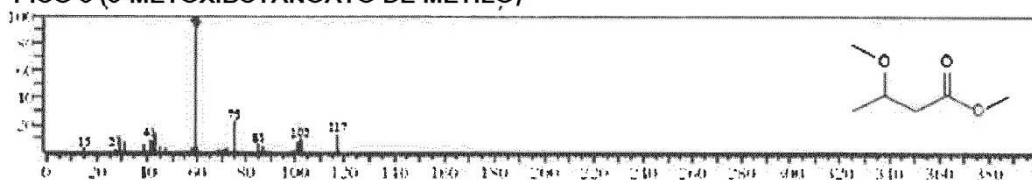
RESULTADO DEL ANÁLISIS DEL ESPECTRO DE MASAS PARA CADA PICO
PICO 1 (CROTONATO DE METILO)



PICO 2 (3-HIDROXIBUTANOATO DE METILO)



PICO 3 (3-METOXIBUTANOATO DE METILO)



PICO 4 (γ -BUTIROLACTONA, GBL)

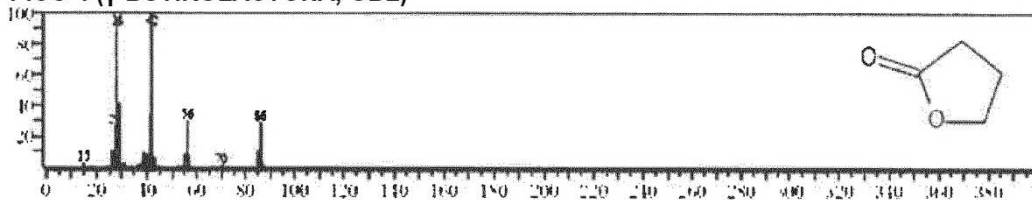
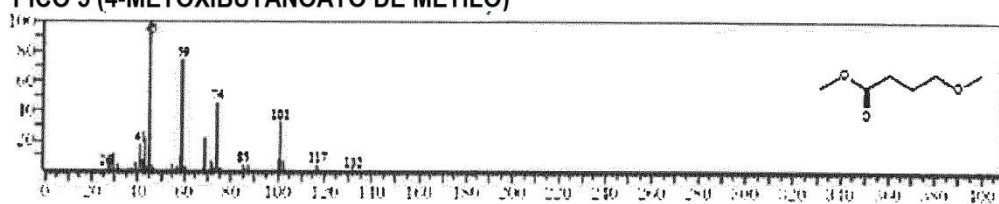
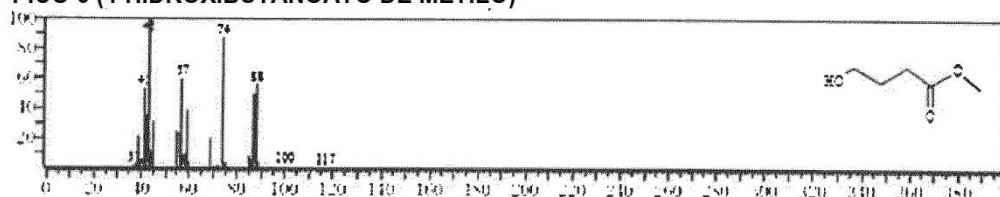


FIG. 6

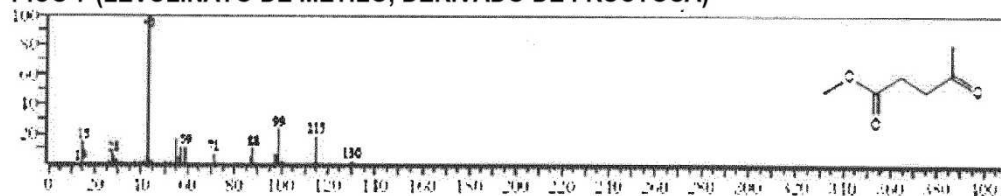
PICO 5 (4-METOXIBUTANOATO DE METILO)



PICO 6 (4-HIDROXIBUTANOATO DE METILO)



PICO 7 (LEVULINATO DE METILO, DERIVADO DE FRUCTOSA)



PICO 8 (BENZOATO DE METILO, DERIVADO DE ÁCIDO BENZOICO COMO PATRÓN INTERNO)

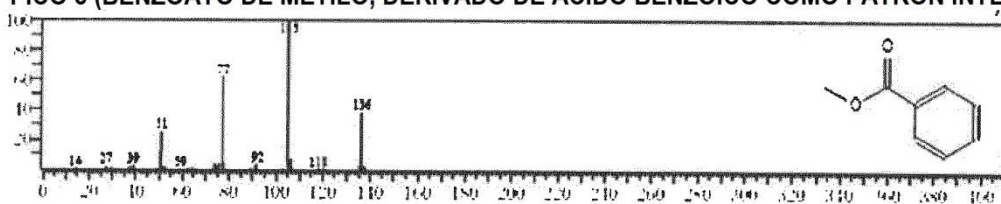


FIG. 7