



REGISTRO DE LA
PROPIEDAD INDUSTRIAL

ESPAÑA

① N.º de publicación: ES 2 019 169

② Número de solicitud: 8903471

⑤ Int. Cl.⁵: C12N 1/20

//(C12N 1/20 C12R 1:01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

A6

⑫ Fecha de presentación: **13.10.89**

④ Fecha de anuncio de la concesión: **01.06.91**

④ Fecha de publicación del folleto de patente:
01.06.91

⑦ Titular/es: **Universidad de Alicante,
Vicerrectorado de Investigación.
Carretera de S. Vicente Raspeig, s/n
03080 Alicante, ES**

⑦ Inventor/es: **Rodríguez Valera, Francisco y
García Lillo, Jose Antonio**

⑦ Agente: **No consta**

⑤ Título: **Procedimiento de fermentación para la producción de células bacterianas que acumulan polihidroxicanoatos.**

⑤ Resumen:

Procedimiento de fermentación para la producción de células bacterianas que acumulan polihidroxicanoatos. La invención describe un procedimiento microbiológico de fermentación por el que se obtienen células con un alto contenido en polihidroxi-butilato (PHB). El procedimiento consiste en la fermentación aerobia de *Haloferax mediterranei* sin tener que utilizar medidas especiales de esterilidad, con el consiguiente ahorro económico en su producción industrial.

El medio de cultivo contiene una alta concentración de sales marinas (25%), además de sales de amonio, hierro y fosfatos. El pH se mantiene próximo a la neutralidad y la temperatura alrededor de 45°C. Como fuente de hidratos de carbono se utiliza glucosa.

La cantidad de al menos uno de substratos esenciales es limitada, a fin de conseguir la acumulación de PHB.

DESCRIPCION

Esta invención se relaciona con procesos de fermentación de un tipo especial de microorganismos, denominados Halobacterias, para la producción en general de cualquier polihidroxialcanoato (indicados de aquí en adelante como PHA) y más en particular para la obtención de polihidroxibutirato (abreviadamente PHB).

El PHB es un poliéster plástico y se puede utilizar en los sistemas de procesado tradicionales ya que se trata de un termoplástico, además es biodegradable y biocompatible.

El PHB es acumulado universalmente por numerosas bacterias trabajándose hasta ahora casi exclusivamente con las del género *Alcaligenes*, *Azotobacter*, *Menthylobacterium* y *Pseudomona*.

En la Patente Europea 0046344, se hace hincapié en un proceso de fermentación continuo utilizando sobre todo, un mutante de la bacteria *Alcaligenes eutrophus* H16, capaz de crecer sobre glucosa. También se mencionan otras especies del mismo género. A su vez en la Patente Europea 0052459 se señala la producción de polímeros basados en la subunidad β -hidroxibutirato por esta misma bacteria.

Para la extracción de los biopolímeros se recurre, en general, a la puesta en contacto de las células bacterianas con un disolvente del PHB que sirva para lixiviarlo del resto de material celular. Algunas bacterias proporcionan al disolvente el PHB, como ocurre con las del género *Azobacter*, mientras que otras, como las de *Pseudomonas* necesitan de una etapa previa de rotura celular, debido a que su pared celular es un serio impedimento para la extracción.

Los métodos de extracción suelen ir precedidos de una etapa donde se separan las células del resto del medio de cultivo fermentado que puede ser por centrifugación, filtrado, o desecación.

Existen numerosos métodos de separación del polímero, como por ejemplo lo que se citan en las patentes ES 488812, US 3036959, US 3275610, US 4101533, US 3107172 ó US 3044942. En ellas se detallan distintos procesos y disolventes para la recuperación de los polímeros.

Las características de un proceso fermentativo para la producción de PHB vienen determinadas por el microorganismo productor. La utilización de eubacterias implica el mantenimiento de una serie de factores y costes clásicos, como podrían ser el mantenimiento de las precauciones estériles en todos los pasos de producción, utilización de medios de cultivo más o menos complejos, con la adición de ciertos oligoelementos, como vitaminas y amoniácidos, calentar para alcanzar la temperatura óptima de crecimiento del microorganismo... etc.

En cambio la utilización de halobacterias ofrece una mayor maniobrabilidad, simplificando el proceso de producción y abaratando costes. Se trata de microorganismos aerobios que crecen a temperaturas usuales de incubación y lo hacen sobre medios extraordinariamente simples sin necesidad de añadir ningún factor de crecimiento especial, que por lo general son caros. Además, dada la elevada concentración de sales que se necesita en el medio, las precauciones de esterilidad

se reducen a la mínima expresión, ya que a la vez se inhibe el crecimiento de cualquier otra bacteria.

Un medio de cultivo típico para la fermentación de halobacterias cuenta con los siguientes elementos:

Fuente de carbono: añadida generalmente en forma de azúcar como por ejemplo: glucosa, sacarosa, almidón celobiosa o lactosa. Estos azúcares pueden añadirse de forma pura y a una concentración conocida o bien pueden suministrarse formando parte de mezclas e hidrolizados complejos que normalmente se utilizan como sustratos en microbiología industrial, como por ejemplo líquidos y polvos de la maceración del maíz, hidrolizados de levaduras y proteínas, melazas sueros lácteos...etc.

Fuente de nitrógeno: que normalmente se añade en forma de sal soluble en agua tipo cloruro o sulfato. La mayor parte de este nitrógeno será utilizado por la halobacteria para la biosíntesis de aminoácidos y proteínas.

Fuentes de fósforo: añadida también normalmente en forma de una sal soluble, tipo fosfato sódico o potásico. El fósforo formará parte de componentes moleculares tan importantes como los ácidos nucleicos o ciertos nucleótidos fosforilados.

Fuentes de azufre potasio, calcio, magnesio, cinc, cobre o hierro: Normalmente no hay que añadir una fuente extra para estos nutrientes ya que o bien forman parte de las sales nitrogenadas, fosfatadas u otras, o bien aparecen formando parte de impurezas a una concentración suficiente. Las cantidades requeridas son mínimas.

Origen: Añadido al medio generalmente por inyección y burbujeo de aire al fermentador para facilitar su solubilidad, el medio suele agitarse.

Sales marinas: a una elevada concentración total que puede oscilar entre el 10 y el 30 % en peso.

La mayor proporción corresponde al cloruro sódico, pero además esta mezcla de sales marinas (referidas de ahora en adelante como SW) lleva un orden decreciente de concentración en: sulfato magnésico, cloruro magnésico, cloruro potásico, cloruro cálcico, bromuro sódico y bicarbonato sódico.

Se ha encontrado que las bacterias particularmente útiles, tanto por la cantidad de PHB que acumulan intracitoplásmicamente como por la elevada conversión del sustrato en PHB, son los pertenecientes al género *Halobacterium*, por ejemplo *H. mediterranei*, *H. cutirrubrum*, *H. saccharovororum*, *H. salinarium*, *H. sodomense*, *H. vallismortis*, *H. volcanii*, *H. gibbonsii* y *H. hispanicum*. Estas especies han sido extensamente descritas en la literatura científica (Syst. Appl. Microbiol. 4 (1983) 369 - 381, Appl. and Envir Microbiol. 51 (1986) 214 - 216) y varias cepas se hayan en los catálogos de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC. 12301 Park Lawn Drive, Rockville, Maryland 20852, USA).

<i>H. mediterranei</i>	ATCC 33500
<i>H. cutirrubrum</i>	ATCC 33170
<i>H. saccharovororum</i>	ATCC 29252
<i>H. salinarium</i>	ATCC 33171

H. sodomense	ATCC 33755
H. vallismortis	ATCC 29715
H. volcanii	ATCC 29605
H. gibbonsii	ATCC 33959
H. hispanicum	ATCC 33960

De todos, el microorganismo preferido para la producción es *H. mediterranei*, y más concretamente la cepa R4, depositada ATCC con el número antes mencionado por uno de los autores de la invención. En segundo lugar el preferido es *H. volcanii* aunque se ha observado que da rendimientos más bajos.

Cuando alguna de esta halobacteria es cultivada crece aeróbicamente sobre un medio de estas características, se reproduce hasta que uno o más de los sustratos esenciales desaparece. Esta reproducción de los microorganismos es lo que se denomina crecimiento. De manera paralela al crecimiento se da un acúmulo de PHB en el interior de las células pero éste no sobrepasa valores de tan solo el 10% del peso seco celular hasta que alguno de los sustratos no se halla en concentraciones limitantes, sólo entonces es cuando aparece una síntesis activa del poliéster pasando por un máximo, de alrededor del 60% del peso seco, al inicio de la fase estacionaria.

Se proporciona así un proceso para la producción de unos poliésteres biodegradables mediante cultivo de halobacterias que son capaces de acumular PHB al ser crecidas sobre un medio apropiado, caracterizado por su elevada concentración de sales marinas. Parte del proceso es conducido hacia la acumulación de biomasa y después mediante la limitación de uno de los sustratos, preferiblemente la fuente de fosfato inorgánico, se conduce hacia la acumulación de PHB. Puede limitarse también la concentración de cualquier otro, como la fuente de nitrógeno, el oxígeno o la SW, con excepción de la de carbono, que normalmente está en exceso para permitir la síntesis del poliéster.

Aparte de colocar las concentraciones adecuadamente de los diferentes sustratos, la fermentación se conducirá bajo condiciones óptimas de pH, temperatura, SW y aireación (a menos que el oxígeno sea utilizado como factor y estimulante de la síntesis para el crecimiento del microorganismo).

Los procesos descritos hasta ahora se denominan cultivos tipo "batch" (lote o discontinuo), pero además, puede operarse en cultivo continuo. En este sistema de producción hay una entrada de medio fresco con uno de los sustratos en concentraciones limitantes y se hace entrar de manera continua o intermitente y a la vez hay una salida continua o intermitente de medio de cultivo gastado (es decir donde el sustrato limitante casi ha desaparecido) y de células. El flujo de entrada y de salida es el mismo de manera que el volumen de fermentación permanece constante. Operando en continuo estas bacterias acumulan menos PHB que en "batch" pero puede extraerse de manera constante.

Se ha observado que en el cultivo continuo de *Haloferax mediterranei* durante largos períodos de tiempo, la producción de PHB permanecía inalterable. La estabilidad en la producción por

parte de una cepa microbiana es una propiedad importante a la hora de utilizarla en cultivo continuo.

Las halobacterias ofrecen además la posibilidad de utilizar recipientes abiertos para la fermentación, ya que la esterilidad se garantiza por la elevada concentración salina. Ello abarata considerablemente los costes implicados en el mantenimiento de la esterilidad y la fabricación del fermentador, ya que, a un nivel industrial, se pueden utilizar estanques más o menos grandes similares a los utilizados en el tratamiento de aguas de residuales o cualquier otro tipo de piscina.

Para el proceso de extracción y purificación del PHB puede utilizarse cualquiera de los procedimientos descritos en las patentes mencionadas con anterioridad. Para halobacterias se ha comprobado que es especialmente útil la lisis de la masa de células separadas del medio, con una disolución acuosa de Hipoclorito Sódico a una concentración entre el 0.1 y 0.5% en peso, con ello se disuelve la mayoría del material celular y se obtienen unos gránulos de PHB blancos en el fondo de la disolución. Estos se recolectan por centrifugación a baja velocidad, con filtración o incluso por decantación y se purifican. Para ello es conveniente someterlo a unos lavados con un disolvente de lípidos y pigmentos como la acetona y el etanol. Por último se podría purificar con un disolvente exclusivo de PHB como por ejemplo el Cloroformo.

Ejemplos

La invención se ilustra con los siguientes ejemplos en los cuales los porcentajes son en peso:

Ejemplo 1

1,5 litros de medio acuoso (A) y 15 g. de glucosa se colocaron en un fermentador de laboratorio de un volumen total de 2 l. El medio A tenía la siguiente composición:

NH ₄ Cl	0.2%
KH ₂ P ₄ O	0.03%
FeCl ₃	0.0005%
SW	25%

Al medio se le añadió un inóculo de aproximadamente de un 2% del volumen de fermentación de *Haloferax mediterranei* R4 (ATCC 33500). Durante la fermentación el pH se mantuvo constante a 7,2 mediante la adición automática de una disolución de NaOH 1 molar. Además, se mantuvo siempre una presión parcial de oxígeno de alrededor del 100% variando el flujo de aire y la agitación. Asimismo, la temperatura se mantuvo a 45 °C. Se alcanzó una concentración máxima de PHB de 0,73 g por litro. La conversión de glucosa en PHB fue del 7,3%. La relación gramos de PHB por gramos de proteína máxima fue de 0,73. Durante todo el proceso de fermentación no fue necesario mantener condiciones de esterilidad alguna.

Ejemplo 2

En un intento de optimizar los resultados se repitió el ejemplo 1 en las mismas condiciones de fermentación y con las mismas cantidades de sustratos a excepción de la fuente de fósforo que se redujo a la mitad, 0,015% en peso. Tras un período de 50 horas se alcanzó una concentración

máxima de PHB de 0.97 g / l de medio de cultivo. La relación máxima de gramos de PHB por gramos de proteína fue de 0.9. La conversión de glucosa subió a un 9.7%.

Ejemplo 3

Se repitió el ejemplo 2 disminuyendo aún más el fosfato inorgánico, 0.0075%. La concentración de PHB máxima alcanzada aumentó a 1,70 gramos a las 69 horas de cultivo. La relación PHB/Proteína aumentó a 1,70. La glucosa inicial se convirtió en PHB en un 17%.

Ejemplo 4

Se repitió el procedimiento de los ejemplos anteriores disminuyendo la concentración de fosfato inorgánico a 0.00375% con lo cual se recolectaban 3.09 gramos de PHB por litro de cultivo; la relación PHB/Proteína aumentaba a 3,95 y se obtenía ya una conversión del 30.9% del sustrato original. Se demuestra, pues, que la limitación de este nutriente incrementa la producción de PHB, tanto en gramos por litro como en porcentaje respecto de la biomasa (medida aquí indirectamente por medio de la proteína total), y el rendimiento respecto de la fuente de carbono original añadida.

Ejemplo 5

Se produce a una nueva fermentación en "batch" con el mismo medio de cultivo basal que en el ejemplo 4 pero se incrementa la concentración de la fuente de carbono (glucosa) a 20 gramos por litro. La cantidad máxima de PHB obtenida fue de 4,16 g por litro y la relación PHB/Proteína aumentó a 5,13 gramos de PHB por gramo de Proteína total. El rendimiento descendió al 20,8%.

Ejemplo 6

Se repitió el ejemplo 5 pero variando la naturaleza de la fuente de carbono. En este caso se añadió almidón. Tras llevar la fermentación bajo condiciones óptimas se obtuvieron 6,48 g / l de cosecha máxima a las 96,5 horas desde que se inoculó. Se consiguió una conversión del 32,4% del almidón original en PHB y una relación PHB/Prot. de 4.08, es decir que en el punto máximo de producción de la biomasa estaba formada por 4 veces más PHB que proteína.

Ejemplo 7

Se procede al cultivo en continuo de la halobacteria *Haloferax mediterranei* en el mismo fermentador experimental descrito en el ejemplo 1 y utilizado en los ejemplos 1 al 6. El medio de cultivo estaba formado por los nutrientes y concentraciones indicadas en 6 (con excepción del almidón que se redujo al 1%) y se le aplicó un flujo de entrada y salida de 30 mililitros por hora, lo cual define una tasa de dilución de 0.02 1/hora (la tasa de dilución es el flujo por unidad de volumen). Este sistema daba una produc-

ción de 1,48 g de PHB por litro de medio, este PHB suponía un 42,29% del peso seco de la biomasa, el flujo de salida contenía 93,3 miligramos de almidón más glucosa como consecuencia de la hidrólisis del primero. El rendimiento del PHB fue del 0,15 en tanto por uno, el de la biomasa, respecto del sustrato también fue del 9,35.

Ejemplo 8

Se repite el ejemplo 7 en su integridad pero a una tasa de dilución de 0,04 1/hora (60 mlit de medio cultivo, fresco a la entrada y gastando a la salida por hora). Una vez estabilizado en estado estacionario se obtenía 1,62 g de PHB por litro, esto suponía aproximadamente un 46% del peso seco celular y rendimientos del orden del 0,35. A la salida se detectaron 81,4 mgr. de almidón más glucosa junto con la biomasa.

Ejemplo 9

En esta experiencia se prepara 20 l de medio idéntico al del ejemplo 6, es decir un medio con sales marinas totales a una concentración del 25%, con la fuente de fosfato inorgánico optimizadas (0,00375%) y con almidón al 2%. Como única precaución de esterilidad se calentó el medio de cultivo con el recipiente a 70 °C., durante la fermentación no se guardaron condiciones estériles. Se mantuvo termostatzado a 37 °. y con una aireación de unos 20 l. de aire / minuto aproximadamente. Al cabo de unas 120 horas de fermentación de *Haloferax mediterranei*, se obtuvo una biomasa de 71 g que estaba formada en un 32% por PHB. Durante todo el proceso no hubo un ajuste del pH y el medio se fue acidificando como consecuencia de la secreción de compuestos orgánicos de carácter ácido, derivadas del metabolismo bacteriano.

En la figura 1 y 2 se muestran las curvas típicas de producción de *Haloferax mediterranei* R4:

Figura 1:

Haloferax mediterranei R4 crecida sobre glucosa en cultivo discontinuo.

- (●) Densidad óptica a 520 nm.
- (■) Proteína g/l (PROT).
- (▲) Glucosa g/l (GLU).
- (□) Fosfato inorgánico g/l (Pi).
- (○) Poliéster g/l (PHB).

Figura 2:

Haloferax mediterranei R4 crecidas sobre almidón en continuo.

- (△) Biomasa g/l (X).
- (●) Poliéster g/l (PHB)
- (△) Fuente de carbono g/l (S).
- (■) Fosfato inorgánico g/l (Pi).
- (○) Proteína (PROT). g/l.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de fermentación para la producción de células bacterianas que acumulan poli-*-*hidroxi-*-*butirato (PHB), comprendiendo el cultivo aeróbico de un microorganismo acumulador de PHB del género *Halobacterium*, en un sistema de fermentación (uno o varios fermentadores) con un medio acuoso, con alta concentración en sales marinas, compuesto por, sales nutrientes y una fuente de carbono y energía, en forma de compuestos solubles en agua y asimilables por el microorganismo, el cual es continua o intermitentemente extraído a igual flujo, conteniendo el medio acuoso de salida, células bacterianas provenientes del sistema de fermentación, a fin de mantener el volumen del medio acuoso del sistema de fermentación constante. La cantidad aportada de, al menos, uno de los sustratos esenciales para el crecimiento del microorganismo, pero no para la acumulación de PHB, es restringida de tal forma que las células bacterianas de salida contienen en promedio, al menos un 10% en peso de PHB.

2. Un procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el requisito esencial para el crecimiento restringido es el fosfato inorgánico, el nitrógeno asimilable, el oxígeno o la concentración salina (SW) por este orden de preferencia a fin de lograr el máximo rendimiento, o bien una combinación de estos factores.

3. Un procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 y 2 en que la cantidad de, fosfato inorgánico, expresado como PO_4H_2K suministrado está comprendido entre 0,0019 y 0,0075 g/l de medio de cultivo y/o nitrógeno asimilable suministrado está comprendido entre 1 y 3 g de cloruro amónico por litro de medio.

4. Un procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 3 en que las células bacterianas del sistema de fermentación contienen entre un 10% y un 65% de PHB.

5. Un procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 4 en que el medio acuoso de salida del sistema de fermentación contiene una cantidad residual de los dichos compuestos solubles en agua que forman las fuentes de carbono y energía, de al menos 0,1 g/l.

6. Un procedimiento de acuerdo con cada una de las reivindicaciones 1 a 5 en que preferentemente el medio acuoso conteniendo las células

bacterianas de salida de un primer sistema de fermentación junto con compuestos solubles asimilables por el microorganismo, es aeróbicamente cultivado en un segundo sistema de fermentación hasta incrementar el contenido de PHB de las células.

7. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6 por el cual no se aporta al último sistema de fermentación ninguna cantidad adicional del sustrato esencial para el crecimiento, cuyo aporte en el primer sistema de fermentación era restringido.

8. Un proceso de acuerdo con las reivindicaciones 6 y 7 en que el cultivo del último sistema de fermentación sale en continuo.

9. Un proceso de acuerdo con las reivindicaciones 6 a 8 en que el cultivo del microorganismo en dicho último sistema de fermentación es continuado hasta que las bacterias contienen entre el 40% y 60% en peso de PHB.

10. Un procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 9 en el que el medio de cultivo acuoso presenta un grado de salinidad, en sales minerales (SW), superior al 10%.

11. Un procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 10 en que tanto las fuentes de carbono y energía, de oxígeno en forma de aire, así como las instalaciones de producción no requieren de esterilización, ni precauciones especiales de asepsia.

12. Un procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 11 en que el inóculo inicial aportado al sistema de fermentación es mantenido prácticamente de forma indefinida sin descenso de producción por inestabilidad de la cepa inoculada.

13. Un sistema de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 12 en que el sistema físico de fermentación está constituido por balsas con suficiente aireación de la solución, cubiertas o no, de pequeño tamaño o gran tamaño, operadas de forma continua o discontinua.

14. Un sistema de acuerdo con la reivindicación 13 en el que no se produce ninguna regulación de los parámetros de fermentación, como el pH, durante el proceso fermentativo, pudiendo ser operado el proceso entre los 35 y 50 °C., aportándose únicamente las fuentes de carbono y energía así como los requerimientos esenciales limitantes como se ha indicado anteriormente.

