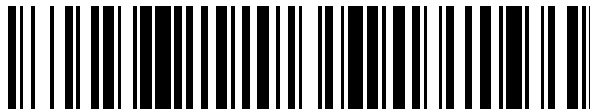


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 426 671**

21 Número de solicitud: 201230438

51 Int. Cl.:

**C12P 7/62** (2006.01)

**C12R 1/00** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

22 Fecha de presentación:

**23.03.2012**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**24.10.2013**

Fecha de la concesión:

**07.05.2014**

45 Fecha de publicación de la concesión:

**14.05.2014**

56 Se remite a la solicitud internacional:

**PCT/ES2013/070189**

73 Titular/es:

**UNIVERSIDADE DA CORUÑA (100.0%)  
A Maestranza, s/n  
15071 A Coruña (A Coruña) ES**

72 Inventor/es:

**VEIGA BARBAZAN, M<sup>a</sup> Del Carmen;  
KENNES, Christian y  
BEN GARCIA, Marta**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

54 Título: **PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN DE POLIHIDROXIALCANOATOS A PARTIR DEL AGUA RESIDUAL DE LA INDUSTRIA CERVECERA.**

57 Resumen:

Procedimiento de obtención de polihidroxicanoatos a partir del agua residual de la industria cervecera. Procedimiento de obtención de polihidroxicanoatos que consiste en tres etapas: una fermentación acidogénica del efluente residual de una industria cervecera en un reactor para la obtención de ácidos grasos volátiles, alimentación del efluente fermentado obtenido en la anterior a un reactor que contiene un cultivo mixto de microorganismos con objeto de seleccionar una biomasa con alta capacidad de acumulación de polihidroxicanoatos, y alimentación de forma discontinua y mediante la adición de pulsos consecutivos del efluente fermentado obtenido en la primera etapa a un reactor que contiene la biomasa seleccionada en la segunda etapa.

**ES 2 426 671 B2**

**DESCRIPCIÓN**

Procedimiento de obtención de polihidroxicanoatos a partir del agua residual de la industria cervecera

**5 CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención es un procedimiento de producción microbiana de un bioplástico a partir de aguas residuales de la industria cervecera. Dicho procedimiento se encuentra relacionado con la bioingeniería y con la industria del plástico.

10

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

El uso intensivo y extensivo de los plásticos en nuestra sociedad se encuentra ante dos problemas fundamentales: por un lado, la fabricación dependiente del petróleo, un recurso natural no renovable, y por otro, el impacto medioambiental que causan debido a la resistencia a la biodegradación.

15

Actualmente, con el fin de solventar los problemas derivados del uso del plástico convencional, se buscan materiales con propiedades similares pero que sean de fácil degradación, entre los que se encuentran los bioplásticos o biopolímeros. El término de bioplásticos o biopolímeros engloba básicamente tres tipos de polímeros: polímeros sintetizados químicamente, plásticos biodegradables basados en almidón (se obtienen por mezcla de almidón y un plástico, por ejemplo polietileno) y los polihidroxicanoatos.

20

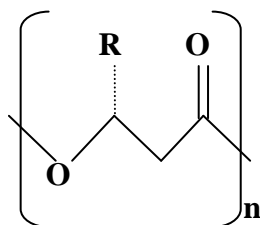
Los polihidroxicanoatos (PHA) son polímeros 100% degradables, ya que son sintetizados como material de reserva por un gran número de bacterias Gram positivas y Gram negativas pertenecientes a más de 75 géneros diferentes. Estos polihidroxicanoatos proporcionan una buena alternativa a los plásticos derivados del petróleo ya que presentan propiedades similares a las del polietileno y a las del polipropileno.

25

Los polihidroxicanoatos son considerados de gran interés industrial como plásticos biodegradables y tienen aplicaciones en diferentes áreas: materiales de embalaje (por ejemplo envases, films, etc), industria farmacéutica, medicina, industria alimentaria, industria de la cosmética y agricultura.

30

Los PHA son polímeros lineales de 3-hidroxiácidos en los cuales el grupo carboxílico de un monómero forma un enlace de tipo éster con el grupo hidroxilo del monómero siguiente.



La composición de la cadena lateral o átomo R determina la identidad de la unidad monomérica.

35

Actualmente se conocen aproximadamente 125 ácidos hidroxicanoicos formando parte de los PHA (identificados en diversos géneros bacterianos). Entre estos se pueden encontrar 3-hidroxicanoatos de 3 a 14 átomos de carbono con una larga variedad de grupos saturados de cadena lineal o ramificada conteniendo grupos laterales alifáticos o aromáticos.

40

La presente invención utiliza la biomasa (un cultivo mixto) como inóculo y agua residual de la industria cervecera como sustrato.

En la industria cervecera se generan efluentes en los procesos de fabricación del mosto, fermentación del mosto, maduración de la cerveza, filtración, preenvasado y envasado, lo que da lugar a un gran volumen de residuos líquidos que deben ser tratados antes de ser vertidos al medio ambiente.

45

Estas aguas residuales tienen un elevado contenido en materia orgánica de fácil degradación, fundamentalmente ácidos grasos, etanol y azúcares.

50

Actualmente la producción comercial de PHA se basa en procedimientos que emplean cultivos puros de microorganismos, lo que implica un enorme gasto en esterilización, y sustratos caros. La producción de PHA por cultivos puros tiene lugar cuando un nutriente esencial, a excepción de la fuente de carbono, actúa como limitante para el crecimiento.

En el estado de la técnica se conocen algunos procedimientos de producción de polihidroxicarboxilatos. EP1400569 propone un sistema para la producción de biopolímeros a partir del empleo de un agua residual como sustrato y de cultivos mixtos como inóculo. El sistema consta de 2 etapas. La primera etapa es una etapa acidogénica durante la cual la materia orgánica compleja presente en el medio es degradada hasta obtener moléculas más simples como son los ácidos grasos volátiles. El efluente procedente de esta primera etapa se alimenta en la etapa 2. La etapa 2 es una etapa aerobia desarrollada en un reactor secuencial (*Sequencing Batch Reactor*, SBR). Durante esta etapa se alimenta un cultivo mixto con el efluente procedente de la primera etapa bajo condiciones dinámicas de alimentación.

Sin embargo en la presente solicitud se propone un proceso en tres etapas aplicado a un tipo concreto de agua residual, efluente de una industria cervecera, con distintas condiciones de operación para cada una de las etapas del proceso. EP1400569 propone la operación del reactor a altas velocidades de carga orgánica (VCO), por encima de 20 g DQO/L-d (g DQO/litro-día, siendo DQO la demanda química de oxígeno), aplicando ciclos cortos de operación, 2 horas. Sin embargo, en la presente solicitud se propone trabajar con agua de cervecera a VCO de 3,6 g DQO/L-d, empleando ciclos de operación de 12 horas. Una VCO de 3,6 g DQO/ L-d equivale a 100 Cmmol/ L-d (mmol de carbono/litro-día).

WO2011/073744 plantea la producción de polihidroxicarboxilatos en tres etapas a partir del efluente de una industria papelera y un lodo aerobio enriquecido en bacterias filamentosas con alta capacidad acumuladora. Se aplican concentraciones limitantes de nutrientes esenciales (relación C/N/P 100/4,4/1,3), de algún micronutriente esencial y baja concentración de oxígeno (concentración no superior de 2 mg/L) con el objeto de enriquecer el lodo en microorganismo filamentosos. Sin embargo, en la presente solicitud se plantea una relación C/N/P bien distinta, de entre 11/1,7/1 y 50/5/1, y no se limita la concentración de oxígeno suministrado, siendo la velocidad de flujo de aire de 1 vvm (volumen de aire por volumen de líquido por minuto).

El problema que plantea la técnica es proporcionar un procedimiento optimizado de obtención de polihidroxicarboxilatos con cultivos mixtos, que tenga rendimientos que permitan que dicho procedimiento sea competitivo en relación a los procedimientos de obtención de polihidroxicarboxilatos con cultivos puros.

### **DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN**

La presente invención es un procedimiento de obtención de polihidroxicarboxilatos, que comprende las siguientes etapas:

a) fermentación acidogénica del efluente residual de una industria cervecera en un reactor para la obtención de ácidos grasos volátiles, caracterizado por que el tiempo de retención hidráulica es entre 1 y 1,6 días, la temperatura es entre 30 y 37°C y el pH es 6,0,

b) alimentación del efluente fermentado obtenido en la etapa a) a un reactor que contiene un cultivo mixto de microorganismos con objeto de seleccionar una biomasa con alta capacidad de acumulación de polihidroxicarboxilatos, caracterizado por que se opera en periodos alternativos de ausencia y exceso de sustrato de 12 horas, la relación carbono/nitrógeno/fósforo es entre 11/1,7/1 y 50/5/1, la velocidad de carga orgánica es entre 100 y 120 Cmmol/L-d, el tiempo de retención de sólidos es entre 6 y 10 días, el flujo de aire es 1 vvm, y la temperatura es 30°C,

c) alimentación de forma discontinua y mediante la adición de pulsos consecutivos del efluente fermentado obtenido en la etapa a) a un reactor que contiene la biomasa seleccionada en la etapa b), caracterizado por que el flujo de aire es 1 vvm y la temperatura es 30°C.

La primera etapa del procedimiento de la invención consiste en una fermentación acidogénica durante la cual la materia orgánica compleja presente en el agua residual de la industria cervecera es transformada preferiblemente en reactivos SBR en moléculas más simples como son los ácidos grasos volátiles. Los ácidos grasos volátiles son el sustrato (efluente fermentado) que se empleará para la producción posterior de los polihidroxicarboxilatos.

El efluente residual fermentado en el reactor acidogénico es posteriormente empleado como sustrato tanto en la etapa b) de enriquecimiento del cultivo mixto en bacterias acumuladoras de polihidroxicarboxilatos como en la etapa c) de producción del biopolímero.

En la segunda etapa del procedimiento de la invención tiene lugar el enriquecimiento de un cultivo mixto en bacterias acumuladoras de PHA. Para favorecer la acumulación de PHA se aplican condiciones que limitan el crecimiento de las bacterias. Las condiciones limitantes consisten en someter a los microorganismos a periodos alternativos de ausencia y exceso de sustrato. Sometidos a estas condiciones las bacterias almacenan los PHA como reservas intracelulares, que podrán utilizar como sustrato o como fuente de energía. En esta etapa de enriquecimiento se emplea el efluente producido en la etapa anterior de fermentación acidogénica.

Tanto la etapa de enriquecimiento del cultivo mixto como la etapa de producción de polihidroxicarboxilatos se desarrollan preferiblemente en reactores SBR. Los SBR permiten aplicar condiciones alternas de exceso/ausencia

de sustrato (condiciones dinámicas de alimentación aerobia o ADF) que favorecen la adaptación fisiológica del lodo favoreciendo la acumulación del polímero.

5 Mediante el control de las condiciones de operación y de los parámetros operacionales es posible favorecer el desarrollo de una biomasa con alta capacidad de acumulación de polihidroxiclcanoatos. Durante la etapa de enriquecimiento del lodo se adicionan macronutrientes (nitrógeno y fósforo) en concentración suficiente para que estos no sean limitantes, de esta manera se favorece el crecimiento de la biomasa a partir del polímero acumulado durante la etapa de ausencia de sustrato. Las bacterias con alta capacidad acumuladora presentarán una gran ventaja competitiva frente a aquellas de baja capacidad acumuladora, consiguiéndose enriquecer el cultivo en bacterias con alta capacidad para acumular polihidroxiclcanoatos. En la presente invención la relación C/N/P es entre 11/1,7/1 y 50/5/1.

10 El TRS también juega un papel importante en la selección de un lodo. Sin embargo, en el caso de que se empleen sustratos complejos, este no se debe de fijar en valores demasiado bajos, dado que la complejidad del sustrato puede ralentizar las cinéticas del proceso. En tal caso, bajos TRS llevarían a concentraciones de biomasa bajas al comienzo del ciclo lo que favorecería el aumento del tiempo en el cual el sustrato está presente en el medio. Cuanto más tiempo está el sustrato en el medio más se favorece el desarrollo de bacterias con baja capacidad acumuladora; estas sufren una adaptación fisiológica en la que se favorece el crecimiento frente a la acumulación de reservas internas. En la presente invención el TRS tiene valores comprendidos entre 6 y 10 días.

20 El flujo de aire también es un parámetro clave, ya que flujos de aire insuficientes pueden favorecer el desarrollo de una biomasa con una decantación pobre. Es importante no limitar el oxígeno en el medio de crecimiento. En la presente invención el flujo de aire es 1 vvm (volumen de aire por volumen de líquido por minuto).

25 La temperatura en la etapa b) de la presente invención es 30°C, ya que dicha temperatura favorece las cinéticas del proceso, permitiendo que el sustrato sea consumido más rápidamente restableciéndose el régimen de presencia/ausencia de sustrato. Otra medida adoptada para favorecer que el régimen de presencia/ausencia de sustrato se restablezca es el empleo de tiempos de ciclo largos (12 horas).

30 Finalmente en la tercera etapa del procedimiento de la invención a estos lodos enriquecidos en bacterias acumuladoras de PHA se les alimenta de forma discontinua un efluente con un alto contenido en ácidos grasos volátiles para transformarlos en bioplástico. El sustrato se adiciona en varios pulsos para evitar una posible inhibición por sustrato.

35 Una realización preferible es el procedimiento de la invención, donde en la etapa a) el tiempo de retención hidráulica es 1,6 días y la temperatura es 30°C.

40 Otra realización preferible es el procedimiento de la invención, donde en la etapa b) la relación carbono/nitrógeno/fósforo es 11/1,7/1, la velocidad de carga orgánica es 100 Cmmol/L-d y el tiempo de retención de sólidos es 6 días.

Una realización es el polihidroxiclcanoato obtenido según el procedimiento de la invención, donde dicho polihidroxiclcanoato contiene 70% hidroxibutirato y 30% hidroxivalerato.

#### 45 **MODOS DE REALIZACIÓN PREFERENTE**

Ejemplo 1. Producción de polihidroxiclcanoatos en un reactor de tipo SBR alimentado con agua residual de la industria cervecera.

50 El agua residual de la industria cervecera se trató primeramente en un reactor acidogénico de tipo SBR. La fermentación acidogénica se llevó a cabo a un Tiempo de Retención Hidráulica (TRH) de 1,6 días, temperatura de 30°C, y con control de pH a 6,0. El porcentaje de acidificación alcanzado fue del 60%, presentando la siguiente composición en ácidos grasos: 60% acético, 16% propiónico, 12% butírico y 12% n-valérico. La DQO total del agua residual alimentada oscila entre 4000-6000 mg/L.

55 El enriquecimiento del cultivo mixto de la etapa aerobia del proceso se realizó en un reactor SBR con un volumen útil de 1L operando bajo condiciones dinámicas de alimentación aerobia. El SBR se operó con un ciclo de 12 horas de duración, distribuyéndose en las siguientes etapas: etapa de aireación (10,8 horas), etapa de decantación (1 hora) y etapa de vaciado (0,2 horas). Durante los dos primeros minutos de la etapa de aireación el medio descargado del reactor se repuso con agua de cervecera previamente fermentada. El reactor se operó con un TRH y TRS de 1 y 6 días, respectivamente. La temperatura del reactor se controló a 30°C por medio de un baño termostático y el flujo de aire se reguló a 1 vvm mediante el empleo de rotámetro. El pH no se controló aunque sí se monitoreó. La VCO aplicada al reactor fue de 100 Cmmol/L-d. Junto con la alimentación y por medio de otra bomba peristáltica se adicionó una disolución concentrada de cloruro amónico y potasio dihidrógeno fosfato con objeto de mantener la relación C/N/P en 11/1,7/1. Asimismo se adicionó tiurea al medio para inhibir la nitrificación y que todo el nitrógeno adicionado al medio sea empleado para el crecimiento celular.

5      Bajo estas condiciones, durante la operación en continuo del reactor se consiguieron rendimientos de acumulación del orden de 0,5 Cmmol/Cmmol. Por otro lado las velocidades de consumo de sustrato y de producción de polímero fueron relativamente altas, 1,35 Cmmol/CmmolX·h (mmol de carbono de sustrato/mmol de biomasa activa· hora) y 0,35 Cmmol/CmmolX·h (mmol de carbono de PHA/mmol de biomasa activa·hora), respectivamente.

10     Se operó al reactor durante un período de 3 veces el TRS, tiempo para el cual se consideró que el reactor alcanzó el estado estacionario. El estado estacionario se caracterizó por la obtención de tiempos de *feast* (tiempo en el que el sustrato está presente en el medio) reproducibles, una concentración de la biomasa constante y una variación constante en los parámetros del sistema.

15     Una vez que el reactor estuvo en estado estacionario se realizaron varios ensayos discontinuos con objeto de comprobar la capacidad del lodo seleccionado bajo estas condiciones. Durante la realización de estos ensayos, se adicionaron varios pulsos de sustrato conteniendo una concentración de ácidos grasos volátiles de 50 Cmmol/L, mientras que no se adicionaron nutrientes. El resto de las condiciones operacionales se mantuvieron al igual que en la operación en continuo del reactor.

20     La biomasa enriquecida bajo estas condiciones presentó un contenido de PHA en peso de célula seca del 50-60%. El polímero obtenido con este sustrato bajo las condiciones descritas fue un copolímero conteniendo unidades de hidroxibutirato e hidroxivalerato en una proporción 70%:30%.

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento de obtención de polihidroxicanoatos, que comprende las siguientes etapas:
  - 5 a) fermentación acidogénica del efluente residual de una industria cervecera en un reactor para la obtención de ácidos grasos volátiles, caracterizado por que el tiempo de retención hidráulica es entre 1 y 1,6 días, la temperatura es entre 30 y 37°C y el pH es 6,0,
  - 10 b) alimentación del efluente fermentado obtenido en la etapa a) a un reactor que contiene un cultivo mixto de microorganismos con objeto de seleccionar una biomasa con alta capacidad de acumulación de polihidroxicanoatos, caracterizado por que se opera en periodos alternativos de ausencia y exceso de sustrato de 12 horas, la relación carbono/nitrógeno/fósforo es entre 11/1,7/1 y 50/5/1, la velocidad de carga orgánica es entre 100 y 120 Cmmol/L·d, el tiempo de retención de sólidos es entre 6 y 10 días, el flujo de aire es 1 vvm, y la temperatura es 30°C,
  - 15 c) alimentación de forma discontinua y mediante la adición de pulsos consecutivos del efluente fermentado obtenido en la etapa a) a un reactor que contiene la biomasa seleccionada en la etapa b), caracterizado por que el flujo de aire es 1 vvm y la temperatura es 30°C.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, donde en la etapa a) el tiempo de retención hidráulica es 1,6 días y la temperatura es 30°C.
3. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 ó 2, donde en la etapa b) la relación carbono/nitrógeno/fósforo es 11/1,7/1, la velocidad de carga orgánica es 100 Cmmol/L·d y el tiempo de retención de sólidos es 6 días.
- 20 4. Un polihidroxicanoato obtenido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que dicho polihidroxicanoato contiene 70% hidroxibutirato y 30% hidroxivalerato.