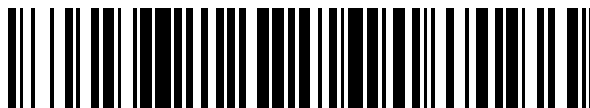


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 048 261**

21 Número de solicitud: 202530436

51 Int. Cl.:

**C12P 1/04** (2006.01)

**C12P 7/02** (2006.01)

**C12N 1/20** (2006.01)

**C12P 1/04** (2006.01)

12

## SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**23.05.2025**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**09.12.2025**

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
(90,00%)  
AVENIDA DE SÉNECA, 2  
28040 MADRID (Madrid) ES y  
PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE  
VALPARAÍSO (PUCV) (10,00%)**

72 Inventor/es:

**GONZÁLEZ ROMO, Ernesto Alejandro;  
CARRIÓN LUCAS, Gema;  
SANTOS MAZORRA, Victoria Eugenia;  
BOLÍVAR BOLÍVAR, Juan Manuel;  
LADERO GALÁN, Miguel y  
GUERRERO SIANCAS, Cecilia Andrea**

54 Título: **Purificación de disoluciones por transformación selectiva de azúcares y otros compuestos orgánicos en biopolímeros de acumulación intracelular utilizando células en reposo**

57 Resumen:

Purificación de disoluciones por transformación selectiva de azúcares y otros compuestos orgánicos en biopolímeros de acumulación intracelular utilizando células en reposo.

Las mezclas de azúcares, obtenidas por diferentes procesos de interés, son difíciles de separar debido a la similitud de sus componentes. Dado que la separación de microorganismos es técnicamente sencilla y con costes de inversión moderados, la utilización de microorganismos capaces de transformar los compuestos no deseados en productos de acumulación intracelular resulta atractiva. Sin embargo, se requiere encontrar la modalidad de utilización y el microorganismo más adecuado, ya que de esto depende el rendimiento y la eficacia del proceso.

La invención propone la purificación de disoluciones mediante la transformación selectiva de azúcares y otros compuestos orgánicos en biopolímeros de acumulación intracelular utilizando células en reposo (resting cells) que no proliferan pero que se mantienen metabólicamente activas, como microorganismos pertenecientes a la especie *Cupravidus necator*.

ES 3 048 261 A1

## DESCRIPCIÓN

Purificación de disoluciones por transformación selectiva de azúcares y otros compuestos orgánicos en biopolímeros de acumulación intracelular utilizando células en reposo

5

### SECTOR DE LA TÉCNICA

La presente invención se encuadra en el sector de procesos biotecnológicos para purificación de disoluciones que contienen azúcares y otros compuestos orgánicos. De forma más concreta, se refiere a un proceso para eliminar la glucosa, fructosa, glicerol y citrato, entre otros compuestos orgánicos, presentes en disoluciones mediante la acción microbiana de células en reposo (*resting cells*, células que no proliferan pero que se mantienen metabólicamente activas).

### 15 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Las sustancias de origen natural están formadas por diversos componentes, entre ellos azúcares. Mediante distintos tratamientos se pueden obtener unidades más sencillas (monosacáridos, disacáridos y oligosacáridos) que, a su vez, pueden ser interconvertidas mediante procesos químicos y bioquímicos. Como resultado de todos estos (bio)procesos se generan mezclas de compuestos que resultan difíciles de separar debido a la similitud de sus componentes. Los componentes de estas disoluciones pueden ser separados empleando técnicas costosas, como la cromatografía, y otras como la purificación asistida por enzimas o la fermentación microbiana. En estas últimas se utilizan microorganismos y enzimas como biocatalizadores para transformar los compuestos que no resultan de interés en productos que pueden ser separados con mayor facilidad mediante membranas, destilación, cristalización o adsorción.

En relación con los procesos enzimáticos, es conocida la utilización de la enzima glucosa oxidasa (por si sola o en conjunto con la enzima catalasa) para tratar una mezcla de glucosa y galactosa con la finalidad de transformar la glucosa presente en ácido glucónico. Así, la mezcla final de galactosa y ácido glucónico se somete a procesos de separación basados en el peso molecular, la carga o afinidad con la finalidad de retirar el ácido glucónico. Como etapa final, puede utilizarse la evaporación

u osmosis inversa para remover parte del agua presente en la mezcla final que contiene galactosa y generar así una disolución concentrada de este azúcar, o acoplar etapas de secado o liofilización para recuperar como producto final galactosa en forma de polvo con una alta pureza (WO9953088A1)

5

En lo que respecta a la utilización de microorganismos con la finalidad de purificar productos, existen varios trabajos donde se ha utilizado la “fermentación microbiana selectiva” (también referida como “bioconversión selectiva” o “bioconversión”, aunque estos términos también comprenden la utilización de enzimas) para recuperar galactooligosacáridos y fructooligosacáridos. Aunque la mayoría de estos trabajos han hecho uso de levaduras (como *Candida utilis*, *Sterigmatomyces elviae*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces nonfermentans*, *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia pastoris*, y *Cyberlindnera jadinii*), también existen reportes de la utilización de bacterias pertenecientes a las especies *Lactobacillus helveticus*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus brevis*. Sin embargo, mientras estos microorganismos degradan los compuestos orgánicos que no resultan de interés liberan al medio una serie de otros compuestos entre los que se encuentran etanol, glicerol y ácidos orgánicos, entre otros. Todos estos compuestos deben ser retirados en etapas posteriores que contribuyen a encarecer y aumentar la complejidad del proceso (Vera C, Guerrero C, Illanes A. 2022. Trends in lactose-derived bioactives: synthesis and purification. Systems Microbiology and Biomanufacturing 2: 393–412)

Considerando que la separación de microorganismos es técnicamente sencilla y con costes de inversión moderados, podría resultar atractiva la utilización de microorganismos capaces de transformar los compuestos no deseados en productos de acumulación intracelular. En el año 2010 se estimaba que las bacterias, hongos y protozoos descritos alcanzaban las 45.000, 70.000 y 30.800 especies, respectivamente (Montaño N, Sandoval A, Camargo S, Sánchez J. 2010. Los microorganismos: pequeños gigantes. Elementos 77: 15-23). Dentro de esta vastedad es un reto encontrar el microorganismo más adecuado que, junto con una modalidad de utilización, permita tener un proceso con rendimiento y productividades adecuados para permitir su implementación a gran escala.

Aunque existen varios tipos de polímeros intracelulares (p. ej. polisacáridos, poliamidas, poliésteres y polifosfatos), resultan especialmente atractivos aquellos microorganismos capaces de acumular polihidroxialcanoatos (poliésteres) dado que este subproducto tiene buenas propiedades mecánicas además de que puede ser  
 5 empleado con otros fines. Es posible clasificar los microorganismos que acumulan polihidroxialcanoatos en dos subgrupos, aquellos que lo acumulan mientras se duplican (es decir, asociado al crecimiento) y aquellos que lo acumulan desacoplado a su proliferación (es decir, no asociado al crecimiento). Aquellos que integran este  
 10 último subgrupo resultan de especial interés puesto que sus células pueden ser utilizadas en la modalidad de células en reposo (*resting cells*, células que no proliferan pero que se mantienen metabólicamente activas) para transformar los compuestos no deseados en polihidroxialcanoatos prescindiendo de suplementar otros sustratos requeridos para la duplicación celular (p. ej. fuente de nitrógeno, fósforo, potasio, azufre y elementos traza) cuya adición iría en detrimento del objetivo de la purificación.

15 Aunque varias especies satisfacen los requisitos de ser capaces de degradar compuestos orgánicos y sintetizar polihidroxialcanoatos de un modo no asociado al crecimiento, resulta particularmente interesante la especie *Cupriavidus necator* puesto que es capaz de acumular grandes cantidades de polihidroxialcanoatos (hasta 80% de su masa como polihidroxibutirato) a la vez que se la puede considerar segura al estar  
 20 incluida en la lista QPS (*qualified presumption of safety*) publicada por la EFSA (*European Food Safety Authority*), pese a que a la fecha no cuenta con el estatus GRAS (*generally recognized as safe*) concedido por la FDA (*Food and Drug Administration*) de los Estados Unidos. *Cupriavidus necator* ha sido reclasificada varias  
 25 veces, de modo que trabajos anteriores emplean otras denominaciones para esta bacteria: *Hydrogenomonas eutropha*, *Alcaligenes eutrophus*, *Ralstonia eutropha* y *Wautersia eutropha*. Muchos de los trabajos donde se utiliza esta bacteria han estudiado procesos de fermentación (discontinuos, continuos o discontinuos con alimentación) bajo condiciones heterotróficas para producir polihidroxialcanoatos o en  
 30 condiciones autotróficas con la finalidad de fijar CO<sub>2</sub> oxidando hidrógeno (bacteria *knallgas*, capaz de proliferar en mezclas explosivas de H<sub>2</sub> y O<sub>2</sub>).

Sin embargo, hasta la fecha no hay reportes donde se utilicen microorganismos capaces de acumular biopolímeros con la finalidad de purificar disoluciones. La  
 35 presente invención plantea el uso de microorganismo para purificación de disoluciones

mediante un proceso técnicamente más sencillo y con menores costes de inversión, capaz de alcanzar grados de pureza similares a los que se consiguen con los procesos convencionales.

## 5 EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se enmarca en el espectro de microorganismos que son capaces de degradar compuestos orgánicos para transformarlos en biopolímeros que se acumulan en el interior de las células.

10

Para ello, en la presente invención se emplean células en reposo (*resting cells*) de modo que las células se mantienen metabólicamente activas pero incapaces de proliferar.

- 15 Varios autores reportan que cepas nativas de *Cupriavidus necator*, como la N-1 (cepa tipo, DSM 13513), H1 (DSM 529) y H16 (DSM 428), son capaces de metabolizar acetato, L-aspartato, citrato, fructosa, fumarato, gluconato, L-glutamato, glutarato,  $\beta$ -hidroxibutirato, lactato, L-leucina, oxalacetato y succinato. Sin embargo, estas mismas cepas no serían capaces de utilizar arabinosa, adonitol, benzoato, glucosa, glicerol,
- 20 lactosa, L-lisina, manitol, manosa, melibiosa, L-metionina, ramnosa o xilosa (Balkwill DL. 2015. *Cupriavidus*. In: Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria (eds M.E. Trujillo, S. Dedysh, P. DeVos, B. Hedlund, P. Kämpfer, F.A. Rainey and W.B. Whitman).). Aun así, otras cepas de *Cupriavidus necator* sí pueden metabolizar algunos de estos compuestos, teniendo por ejemplo que las cepas H1G<sup>+</sup>3 (DSM 545)
- 25 y S301/C5 (NCIMB 11599 o CECT 4623) son capaces acumular polihidroxibutirato a partir de glucosa, el monosacárido más abundante en la naturaleza.

- Así, el tratamiento de una disolución que contiene un compuesto metabolizable y uno no metabolizable (o lentamente metabolizable) permitirá la purificación de este último
- 30 mediante el consumo exclusivo (o preferente) del compuesto metabolizable. En el caso de mezclas que contienen n compuestos, la presencia de cada uno de éstos en el producto final dependerá de la velocidad con que cada uno de estos sea asimilado por el microorganismo, de su concentración inicial y del tiempo que se extienda la reacción, siendo este último parámetro factible de ser modificado y optimizado a través de
- 35 distintos ensayos (en el rango de minutos a días).

Por ejemplo, al poner en contacto una disolución que contiene glucosa con células de *Cupriavidus necator* en la modalidad de *resting cells* y realizar cromatogramas de muestras tomadas a distintos tiempos (0, 12 y 24 horas), obtenidos del análisis con una columna Benson Polymeric BP-800 Ca++ a 80 °C con un detector de índice de refracción (a 55 °C) y empleando agua como eluyente (a 0,500 mL/min), se observa (Figura 1) que a medida que avanza el tiempo disminuye el área del pico correspondiente a la glucosa (y en consecuencia su concentración), mientras las áreas de los picos correspondientes a la galactosa y al tampón fosfato permanece constante (y en consecuencia su concentración).

Para cualquier bioproceso resulta relevante mantener condiciones adecuadas de temperatura y pH. Las pruebas muestran que la purificación microbiana de disoluciones con células en reposo de *Cupriavidus necator* puede llevarse a cabo a 30 °C, un valor cercano a la temperatura reportada como óptima para la cepa tipo (27 °C). Sin embargo, la información disponible también muestra que *Cupriavidus necator* se mantiene activo a temperaturas menores (15 °C) y mayores (37 °C), aunque pierde viabilidad a 55 °C. En lo que respecta al pH, en la mayoría de las pruebas se utilizó un tampón fosfato (3,55 g/L de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 1,5 g/L de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) a pH 7.0, que corresponde al rango reportado óptimo para la cepa tipo (7.0-8.0), aunque esta bacteria se mantiene activa en un rango mayor (5.5-9.2). No obstante, se han realizado pruebas adicionales utilizando tampón citrato a pH 7.0 y en ausencia de tampón, obteniendo en estos casos resultados similares a aquellos obtenidos con tampón fosfato. La información disponible también muestra que *Cupriavidus necator* tiene un metabolismo estrictamente respiratorio, de modo que se debe asegurar el adecuado suministro de oxígeno (empleando aire o aire enriquecido con oxígeno) independiente del sistema experimental utilizado (matraces o biorreactores). Las pruebas en matraces se realizaron utilizando matraces de 250 mL utilizando un 20% de su capacidad con una velocidad de agitación de 150 y 180 rpm, mientras que las pruebas en biorreactor se realizaron utilizando una vasija de 2 L con una agitación de 700 rpm y un flujo de aire de 1 L/min. Estos valores se indican a modo referencial, ya que pueden ser modificados y optimizados a través de distintos ensayos.

Tras la remoción de distintos compuestos orgánicos por parte de los microorganismos, la separación de las células se llevó a cabo mediante centrifugación durante 10 min (a

8000 g y 4 °C), lo que permitió recuperar una pasta con la biomasa con un alto contenido de polihidroxibutirato y una disolución empobrecida en el o los compuestos metabolizables (o libres de ellos). No obstante, esta etapa podría reemplazarse por otros procesos, teniendo por ejemplo la microfiltración. Así, la disolución empobrecida o libre de los compuestos metabolizables puede ser sometida a procesos posteriores, entre los que se puede señalar a modo de ejemplo la evaporación, osmosis inversa y secado.

Considerando que en esta invención se emplean células en reposo, la biomasa para las pruebas fue generada utilizando el medio de cultivo descrito por Ramsay et al. (Ramsay BA, Lomaliza K, Chavarie C, Dubé B, Bataille P, Ramsay JA. 1990. Production of poly-(beta-hydroxybutyric-co-beta-hydroxyvaleric) acids. Appl Environ Microbiol. 56 (7): 2093-8). Para esto se emplearon matraces de 1000 mL utilizando el 20% de su capacidad agitados a 150 rpm a 30°C. Sin embargo, la biomasa también podría generarse en matraces modificando cuando cualquiera de estos parámetros, la composición del medio de cultivo (o con una formulación diferente), o incluso empleando un sistema experimental diferente (p. ej. biorreactor). A modo de ejemplo, la biomasa podría ser generada empleando un caldo nutritivo (Medio 1 de la DSMZ sin la adición de agar) al interior de un biorreactor con una aireación de 1 vvm y agitación de 300 rpm, o empleando el Medio 81 de la DSMZ al interior de algún sistema que permita el cultivo autotrófico del microorganismo. La biomasa generada fue cosechada mediante centrifugación durante 10 min (a 8000 g y 4 °C), y puesta en contacto con la disolución que contenía los compuestos que se deseaba remover.

Los costes del procedimiento descrito resultan menores al de otras posibles técnicas (p. ej. cromatografía) puesto que los microorganismos que han acumulado el biopolímero (a partir de los compuestos orgánicos asimilables presentes en la disolución) pueden ser removidos mediante centrifugación, lo que permite recuperar una disolución factible de ser utilizada como tal, o tratada mediante procedimientos conocidos. Asimismo, la biomasa celular puede tratarse para recuperar el biopolímero como un subproducto. En lo que respecta a la utilización de microorganismos de la especie *Cupriavidus necator*, su inclusión en la lista QPS se realizó bajo la clasificación de únicamente con fines de producción (*production purposes only*) con las restricciones de que (1) la cepa no albergue genes de resistencia a antibióticos clínicamente relevantes y de que (2) el producto esté totalmente libre de células

viables. Mientras lo primero lo cumplen muchas cepas de *Cupriavidus necator* (p. ej. N-1, H1, H16, H1G<sup>+</sup>3 y S301/C5), lo segundo puede conseguirse incluyendo una etapa de microfiltración para asegurar la ausencia de microorganismos en la disolución tratada.

5

Este proceso de purificación puede ser incorporado, por ejemplo, en la obtención de galactosa a partir de lactosa, previa hidrólisis de la lactosa. También se puede ser utilizado en la purificación de mezclas de azúcares derivadas de otros procesos (bio)químicos como, por ejemplo, la reacción catalizada por una enzima celobiosa-2-epimerasa mutante capaz de transformar la glucosa en manosa, donde también se genera fructosa a partir de una reacción lateral no deseada. Otro ejemplo de utilidad de este procedimiento sería la eliminación de glucosa y fructosa (además de otros compuestos asimilables) en disoluciones derivadas del tratamiento (bio)químico de residuos vegetales. Estos ejemplos tienen fines ilustrativos, por lo que no limitan la aplicación de la invención.

15

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1. Cromatogramas de muestras tomadas a distintos tiempos (0, 12 y 24 horas) obtenidos del análisis con una columna Benson Polymeric BP-800 Ca<sup>++</sup> a 80 °C con un detector de índice de refracción (a 55 °C) empleando agua como eluyente (a 0,500 mL/min).

20

Figura 2. Perfiles de glucosa (■ y ● en panel A), galactosa (□ y ○ en panel A), polihidroxibutirato (PHB, ■ y ● en panel B) y biomasa libre de polihidroxibutirato (□ y ○ en panel B) registrados en pruebas con disoluciones que contenían glucosa y galactosa en concentraciones iniciales de 10 g/L (■ y □) y 20 g/L (● y ○), y empleando células en reposo del microorganismo *Cupriavidus necator* S301/C5 (NCIMB 11599 o CECT4623).

25

30

Figura 3. Perfiles de glucosa (■ en panel A), fructosa (▲ en panel A), manosa (● en panel A), polihidroxibutirato (PHB, ■ en panel B) y biomasa libre de polihidroxibutirato (□ en panel B) registrados en una prueba con una disolución que contenía glucosa (25 g/L), fructosa (1 g/L) y manosa (4 g/L), y empleando células en reposo del microorganismo *Cupriavidus necator* H1G<sup>+</sup>3 (DSM 545).

35



Figura 4. Perfiles glucosa (■ en panel A), tagatosa (▲ en panel A), galactosa (● en panel A), polihidroxibutirato (PHB, ■ en panel B) y biomasa libre de polihidroxibutirato (□ en panel B) registrados en una prueba utilizando una disolución que contenía glucosa (25 g/L), tagatosa (12,5 g/L) y galactosa (12,5 g/L), y empleando células en reposo del microorganismo *Cupriavidus necator* S301/C5 (NCIMB 11599 o CECT4623).

Figura 5. Rendimientos de glucosa en polihidroxibutirato (PHB, panel A) y velocidad específica de consumo de glucosa (panel B) obtenidos para células en reposo del microorganismo *Cupriavidus necator* H1G<sup>+</sup>3 (DSM 545).

## REALIZACIÓN PREFERENTE DE LA INVENCION

La presente invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos, los cuales no pretenden ser limitativos de su alcance.

### Ejemplo 1.

En este ejemplo se muestra la eficacia de la cepa *Cupriavidus necator* S301/C5 (NCIMB 11599 o CECT4623) en la purificación de una mezcla de glucosa y galactosa.

En la Figura 2 se observa cómo después de transcurridas 12 horas del contacto de la disolución inicial con las células en reposo, se ha consumido prácticamente la totalidad de la glucosa presente en la disolución que contenía inicialmente 10 g/L de glucosa y 10 g/L de galactosa, mientras que la concentración de galactosa permanece constante. Para el caso de la mezcla que inicialmente contenía 20 g/L de glucosa y 20 g/L de galactosa, tras 12 horas se ha consumido el 60% de la glucosa inicial de modo que en lo que respecta a los azúcares, la pureza de la galactosa se ha incrementado del 50% al 71%. Sin embargo, después de 24 horas la concentración de glucosa resulta despreciable en ambos experimentos, de modo que la pureza de la galactosa alcanza valores cercanos al 100%, en lo que respecta a los azúcares.

### Ejemplo 2.

En este ejemplo se muestra la eficacia de la cepa *Cupriavidus necator* H1G<sup>+</sup>3

(DSM 545) en la purificación de una mezcla de glucosa, fructosa y manosa.

En la Figura 3 se puede observar los resultados de poner en contacto una disolución que contiene glucosa (20 g/L), fructosa (1 g/L) y manosa (4 g/L) con las células en reposo. Después de 24 horas se ha consumido prácticamente la totalidad de la glucosa inicial y una parte de la fructosa inicial. Sin embargo, tras 72 horas en el medio líquido se detecta una concentración de manosa similar a la inicial, trazas de fructosa y no se detecta glucosa. Así, en lo que respecta a los azúcares la pureza de la manosa inicia en 16%, y se incrementa hasta alcanzar valores de 84% y 97% a las 24 y 72 horas, respectivamente.

### Ejemplo 3.

En este ejemplo se muestra la eficacia de la cepa *Cupriavidus necator* S301/C5 (NCIMB 11599 o CECT4623) en la purificación de una mezcla de glucosa, tagatosa y galactosa.

En la Figura 4 se observan los resultados de poner en contacto una disolución de azúcares formada por glucosa (25 g/L), tagatosa (12,5 g/L) y galactosa (12,5 g/L) con las células en reposo. En este caso las concentraciones de tagatosa y galactosa permanecen constantes, mientras que la glucosa es consumida. Así, tras 24 horas la concentración de glucosa es mínima, y tras 48 horas no se detecta glucosa en la disolución. De este modo, tras 48 horas la pureza de la tagatosa y galactosa ha pasado del 25% al 50%, en lo que a azúcares respecta.

### Ejemplo 4.

En este ejemplo se muestra la eficacia con que la cepa *Cupriavidus necator* H1G<sup>+</sup>3 (DSM 545) consume glucosa y la transforma en polihidroxibutirato en medios con distinta concentración de tampón fosfato.

Como se puede observar en la Figura 5A, los experimentos llevados a cabo con distintas concentraciones de tampón fosfato muestran rendimientos de glucosa en polihidroxibutirato similares entre sí y similares al control llevado a cabo sin tampón. Esto mismo aplica a la velocidad específica de consumo de glucosa presentada en la

Figura 5B, donde las distintas condiciones arrojan valores similares. Como consecuencia, el tampón fosfato resulta ser un componente prescindible, a la vez que su presencia no perjudica el consumo de glucosa y su transformación en polihidroxibutirato por parte del microorganismo.

5

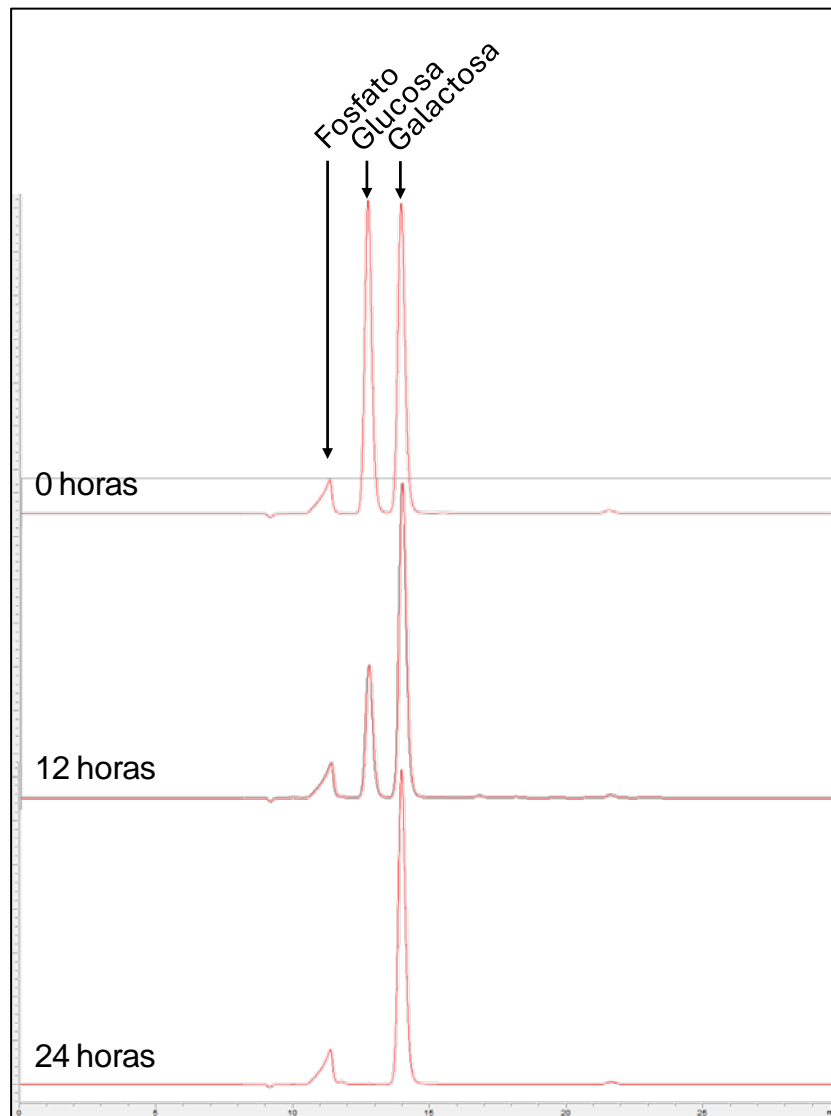
## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la purificación de disoluciones basado en la transformación selectiva de azúcares y otros compuestos orgánicos en biopolímeros de  
5 acumulación intracelular caracterizado por que utiliza células en reposo (*resting cells*) que no proliferan pero que se mantienen metabólicamente activas.
2. Procedimiento de purificación de disoluciones, según reivindicación 1, donde se utilizan microorganismos pertenecientes la especie *Cupriavidus necator*.
- 10 3. Procedimiento, según reivindicación 2, donde el microorganismo es la cepa *Cupriavidus necator* H1G+3 (DSM 545).
4. Procedimiento, según reivindicación 2, donde el microorganismo es la cepa  
15 *Cupriavidus necator* S301/C5 (NCIMB 11599).
5. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde las células previamente crecidas son puestas en contacto con una disolución que contiene los compuestos orgánicos a remover prescindiendo de adicionar una fuente de  
20 nitrógeno u otros compuestos necesarios para el crecimiento del microorganismo.
6. Procedimiento, según reivindicación 5, donde la disolución puede contener sales o un tampón adicionado para amortiguar las variaciones de pH en etapa de purificación o en etapas previas.
- 25 7. Procedimiento, según reivindicación 6, donde el tampón es fosfato o citrato.
8. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la disolución comprende, al menos, un compuesto seleccionado entre glucosa, fructosa, galactosa, manosa, tagatosa, glicerol y citrato o una combinación de  
30 ellos.
9. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el biopolímero de acumulación intracelular es un polihidroxialcanoato.
- 35 10. Procedimiento, según reivindicaciones anteriores, donde biopolímero es polihidroxibutirato.

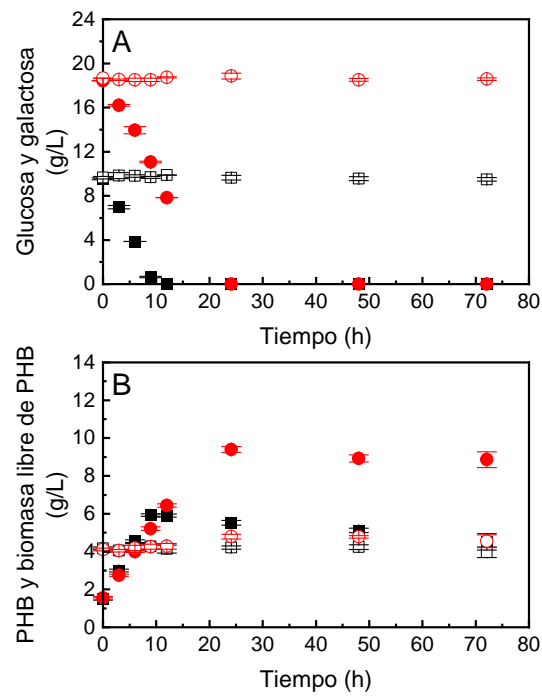
11. Procedimiento, según reivindicaciones anteriores, donde la concentración de azúcares en la disolución inicial es del orden de g/l y la purificación se lleva a cabo a una temperatura entre 15°C y 37°C, a pH entre 7-8 en presencia de agitación y durante un tiempo del orden de minutos o días.
12. Procedimiento, según reivindicación 11, donde la purificación se realiza en presencia de tampón fosfato.

5

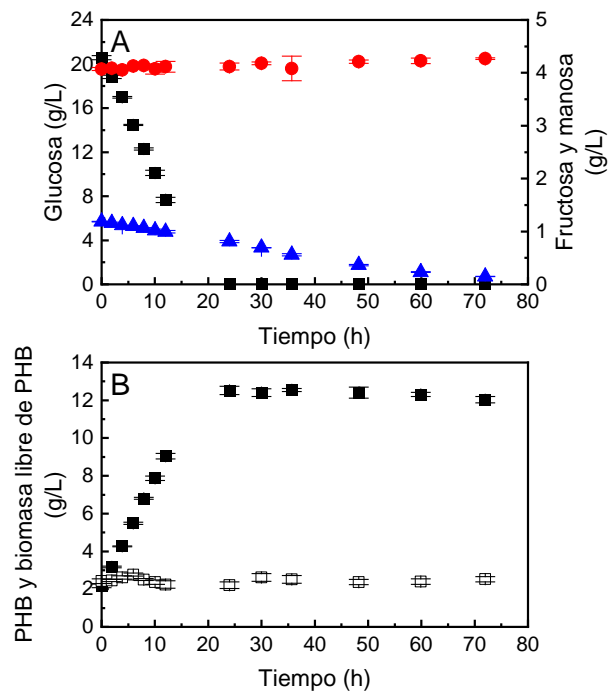
10



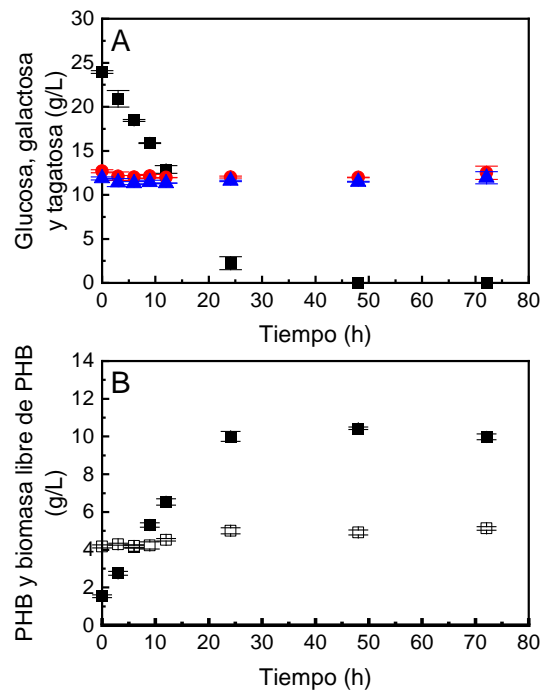
**Figura 1**



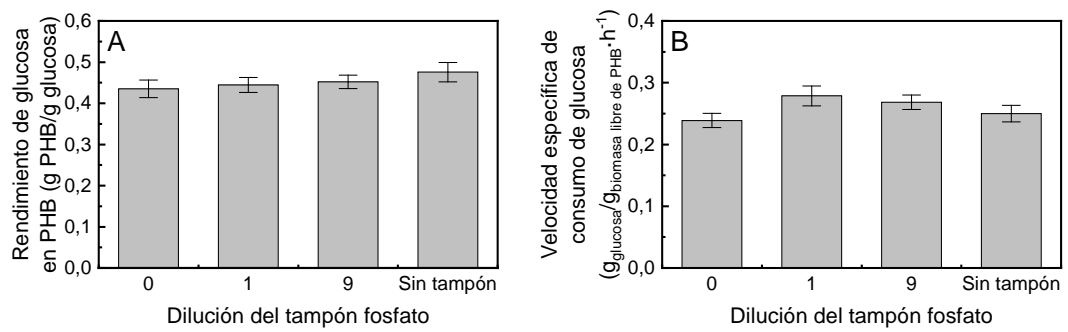
**Figura 2**



**Figura 3**



**Figura 4**



**Figura 5**





21 N.º solicitud: 202530436  
22 Fecha de presentación de la solicitud: 23.05.2025  
32 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

51 Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	56 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	HENDERSON, R. et al. Poly-3-hydroxybutyrate production by washed cells of <i>Alcaligenes eutrophus</i> ; purification, characterisation and potential regulatory role of citrate synthase. Archives of Microbiology. Diciembre 1997. Vol. 168, páginas 486-492 <DOI: <a href="https://doi.org/10.1007/s002030050526">https://doi.org/10.1007/s002030050526</a> > Todo el documento	1-12
X	ROMERO VARGAS, AGUSTÍN. Production of bioplastic precursors (polyhydroxyalkanoates) from macroalgae. Tesis doctoral. Universidad de Cádiz. Octubre 2024 Todo el documento	1-12
X	GIRDHARD, A. et al. Process parameters for influencing polyhydroxyalkanoate producing bacterial factories: an overview. Journal of Petroleum and Environmental Biotechnology. 3 octubre 2013, Vol. 4, Nº 5, páginas 1-8, <DOI: 10.4172/2157-7463.1000155> Todo el documento	1-12
X	MORLINO, M.S et al. <i>Cupriavidus necator</i> as a platform for polyhydroxyalkanoate production: an overview of strains, metabolism, and modeling approaches. Biotechnology Advances. Diciembre 2023, Vol. 69, artículo nº 108264 <DOI: <a href="https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2023.108264">https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2023.108264</a> > Publicado antes de impresión: 27 septiembre 2023 Especialmente: Tabla 2 y apartados 3.2 y 4.1	1-4, 8-10
A	ATLIC, A. et al. Continuous production of poly([R]-3-hydroxybutyrate) by <i>Cupriavidus necator</i> in a multistage bioreactor cascade. Applied Microbiology and Biotechnology. Julio 2011. Vol. 91, Nº 2, Páginas 295-304 <DOI: 10.1007/s00253-011-3260-0> Publicado antes de impresión: 19 abril 2011 Todo el documento	1-12
A	JÄMSÄ, T et al. H <sub>2</sub> - driven xylitol production in <i>Cupriavidus necator</i> H16. Microbial Cell Factories. 23 diciembre 2024, Vol. 23, Nº 1, artículo nº 345 <DOI: 10.1186/s12934-024-02615-7> Todo el documento	1-12

Categoría de los documentos citados X: de particular relevancia Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría A: refleja el estado de la técnica	O: referido a divulgación no escrita P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud
--	--

<b>El presente informe ha sido realizado</b> <input checked="" type="checkbox"/> para todas las reivindicaciones <input type="checkbox"/> para las reivindicaciones nº:
---

<b>Fecha de realización del informe</b> 27.11.2025	<b>Examinador</b> M. Belén González Santos	<b>Página</b> 1/2
---	---	----------------------

## CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**C12P 1/04** (2006.01)

**C12P 7/02** (2006.01)

**C12N 1/20** (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12P, C12N

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

INVENES, EPODOC, Espacenet, Pubmed, Embase, Internet