



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① N.º de publicación: **ES 2 061 405**

② Número de solicitud: 9300944

⑤ Int. Cl.⁶: C12P 7/62

C12N 1/20

C08G 63/06

//(C12P 7/62

C12R 1:065)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

② Fecha de presentación: **04.05.93**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **01.12.94**

Fecha de concesión: **07.09.95**

⑤ Fecha de anuncio de la concesión: **01.11.95**

⑤ Fecha de publicación del folleto de patente:
01.11.95

⑦ Titular/es: **Universidad de Granada
Hospital Real, Cuesta del Hospicio s/n
Granada, ES
Francisco González Lodeiro**

⑦ Inventor/es: **González López, Jesús;
Martínez Toledo, M. Victoria y
Salmerón Mirón, Victoriano**

⑦ Agente: **No consta**

⑤ Título: **Producción de polihidroxicanoatos (PHAs) por Azotobacter chroococcum PHA.**

⑤ Resumen:

La presente invención consiste en un nuevo microorganismo (*Azotobacter chroococcum* cepa PHA, CECT 4435), obtenido mediante mutación inducida con N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina, capaz de acumular durante su crecimiento (sin ninguna limitación, nutricional) poli-hidroxicanoatos (PHAs). La utilización de esta bacteria en procesos fermentativos, utilizando diferentes fuentes de carbono (azúcares, alpechín o ácidos alcanoicos), posibilita la producción de homopolímeros (poli-3 hidroxibutirato) o copolímeros (poli-3 hidroxibutirato/3 hidroxivalerato), siendo la relación molecular de los copolímeros dependiente de la relación nutricional glucosa/propiónico y glucosa/valérico.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el artº 37.3.8 LP.

DESCRIPCION

El objeto de la presente invención es la de producir polihidroxicanoatos (PRAs) mediante una cepa mutante de *Azotobacter chroococcum* PHA, utilizando para ello una tecnología fermentativa y una variedad de sustratos carbonados que incremente la rentabilidad del proceso a nivel industrial.

Antecedentes

Bajo condiciones de cultivo balanceado, son muchas las bacterias que acumulan poli - hidroxicanoatos (PHAs)¹. Las condiciones óptimas para la producción de este polímero, normalmente incluyen un exceso de la fuente de carbono y una deficiencia de un nutriente como nitrógeno, fósforo u oxígeno^{2,3}. Sin embargo, examinando las vías enzimáticas que conducen a la formación de PHAs, se puede comprobar que su síntesis se ve controlada por la acetil - Co aciltransferasa y por la relación NADH/NAD, originándose en altos niveles de NADH una activación de la síntesis de PHAs, al asumir este polímero la función de aceptor terminal de electrones⁴.

Desde el principio de los años ochenta, el poli - β - hidroxi butírico (PHB) ha sido reconocido como un poliéster similar al polipropileno y polietileno. Si bien, los plásticos de PHB no superan en ventajas mecánicas a los plásticos tradicionales, ellos resultan ser biodegradables y biocompatibles, no originando alteraciones en el medio ambiente⁵. Además, copolímeros de hidroxi butírico (HB) e hidroxi valérico (HV) se están produciendo en la actualidad por Imperial Chemical Industries Ltd., bajo la denominación de Biopol, utilizando una cepa de *Alcaligenes eutrophus* cultivada sobre glucosa. Esta bacteria, posee un rendimiento de 0.33 g de PHB por g de glucosa, aunque su desarrollo industrial requiere un doble paso fermentativo, que dificulta seriamente el proceso, ya que la formación del copolímero 3HB - 3HV requiere un segundo crecimiento bacteriano sobre ácido propiónico⁶. En la actualidad, estos plásticos, encuentran buenas perspectivas a escala industrial, como termoplásticos y para la manufactura de materiales, siendo los copolímeros los que presentan un mayor interés debido a sus características de elasticidad y resistencia.

Nuestra aportación, es la introducción a esta tecnología fermentativa de cepas acapsuladas hiperproductoras de la especie *Azotobacter chroococcum*, capaces de desarrollarse sobre un amplio grupo de sustratos y con la particularidad de poder generar copolímeros plásticos en un único paso fermentativo, hecho este que representa una indudable ventaja en la producción industrial de estos polímeros.

Explicación de la invención

La invención consiste en la hiperproducción de PHAs (homo y copolímeros) por la cepa mutante *A. chroococcum* PHA (CECT 4435), durante su crecimiento exponencial, lo que permite su aplicación industrial en procesos fermentativos de un solo estadio, con una disminución de tiempo y coste en relación a los procesos descritos para *A. eutrophus*. Así el proceso fermentativo, utilizando *A. chroococcum* PHA, se hace más competitivo que las actualmente utilizadas para la producción de bioplásticos.

Las cepas acapsuladas obtenidas mediante mutagénesis inducida de cepas salvajes de *A. chroococcum*, se cultivan y acumulan altas cantidades de PHAs en los siguientes sustratos: azúcares simples, almidón, alpechin y mezclas de estos sustratos con ácido valérico y propiónico. Esta versatilidad de sustratos es una de las grandes ventajas que este microorganismo posee sobre otros actualmente utilizados. La cepa *A. chroococcum* PHA es capaz de acumular tanto homopolímeros de 3HB (3 hidroxi butírico) como copolímeros 3HB - 3HV (3 hidroxi butírico - 3 hidroxi valérico) lo que incrementa su interés industrial.

La producción de homopolímeros se origina en procesos fermentativos con fuentes de carbono hidrocarbonado (glucosa, sacarosa, almidón y manitol) alcanzándose producciones de 90% del peso seco celular como PHB. La producción de copolímeros 3HB - 3HV, se alcanza en procesos fermentativos utilizando azúcar - propiónico o azúcar - valérico como fuente de carbono.

Los procesos fermentativos, se realizan en fermentadores de 20 l de capacidad a 28°C, pH 7.2 y tasa de aireación de 0,1 volumen de aire por volumen de medio en el fermentador por minuto. Los medios de cultivo se preparan sobre una base mineral simple, utilizándose N₂ o acetato amónico como fuente de nitrógeno. La cepa hiperproductora se desarrolla sobre las distintas fuentes de carbono en períodos de 18 - 24 horas, alcanzándose los rendimientos máximos de producción de PHA en períodos de tiempo comprendidos entre 48 y 72 horas.

Descripción de la invención*Descripción de la cepa*

5 El microorganismo origen de esta invención es *Azotobacter chroococcum* cepa PHA. Esta bacteria ha sido depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo siéndole atribuido por la Autoridad Internacional de Depósitos el número de orden CECT 4435. Se adjunta fotocopia del Certificado de Depósito.

10 *A. chroococcum* CECT 4435 es una cepa mutante acapsulada, obtenida mediante mutagénesis inducida con N - metil - N' - nitro - nitrosoguanidina de la cepa salvaje *A. chroococcum* H23 de acuerdo con la metodología descrita por Page y Sadoff⁷. Esta cepa salvaje fué aislada por M.V. Martínez Toledo en 1985 de la raíz de *Zea mays*⁸.

15 Las colonias de este microorganismo en medios sin nitrógeno son semitransparentes a las 24 horas de cultivo, transformándose en marrón oscuro tras 48 horas de incubación a 28 °C en aerobiosis.

20 Las características morfológicas y bioquímicas de esta bacteria son las siguientes: es un bacilo Gram negativo con extremos redondeados y un tamaño de 1,1 por 3,7 µm durante la fase exponencial de crecimiento, es móvil por flagelos peritricos, hidroliza el almidón y da positiva la prueba del manitol, no utilizando la ramnosa. Este microorganismo produce quistes en medios libres de nitrógeno adicionados de N - Butanol. Esta cepa es capaz de fijar nitrógeno atmosférico en aerobiosis, siendo sus márgenes de pH de 6,4 a 9. Este microorganismo ha sido clasificado según el Bergey Manual of determinative Bacteriology como *A. chroococcum*.

25 El cultivo de *A. chroococcum* CECT 4435 se realiza en medios químicamente definidos en base a la siguiente composición:

	Glucosa	5,0 g
	K ₂ HPO ₄	0,64 g
30	KH ₂ PO ₄	0,16 g
	NaCl	0,2 g
	MgSO ₄ 7H ₂ O	0,2 g
	CaSO ₄ 2H ₂ O	0,05 g
35	NaMoO ₄ 2H ₂ O	0,01 g
	FeSO ₄	0,003 g
	H ₂ O destilada-. csp. 1000 ml	

40 El pH se ajusta a 7. 0 y las condiciones de incubación se realizan en aerobiosis a 28 - 30 °C durante 48 h. Los medios de cultivo pueden ser adicionados de 0,1 - 0,3% de NH₄CL en el caso de desear el crecimiento adiazotrófico del microorganismo. obviamente, el medio de cultivo se puede transformar en sólido mediante la adición de 15 g/l de agar.

45 La cepa mutante *A. chroococcum* PHA produce durante su crecimiento logarítmico PHB o PHAs, utilizando una amplia variedad de fuentes de carbono, que pueden ser especificadas en los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1

50 Las condiciones de cultivo seleccionadas para el proceso fermentativo fueron:

	Glucosa	5,0 g
	K ₂ HPO ₄	0,64 g
	KH ₂ PO ₄	0,16 g
55	NaCl	0,2 g
	MgSO ₄ 7H ₂ O	0,2 g
	CaSO ₄ 2H ₂ O	0,05 g
	NaMoO ₄ 2H ₂ O	0,01 g
	Citrato Férrico	60 microM
60	H ₂ O destilada.... csp.	1000 ml

La temperatura de incubación fue de 30 °C y el pH de 7.0.

ES 2 061 405 B1

Bajo estas condiciones de cultivo se realizaron dos grupos de experiencias, una de ellas con la adición de 15 mM de acetato amónico y otra sin la adición de NH_4^+ , determinándose en cada caso crecimiento bacteriano, producción de biomasa y % de producción de PHB. Los resultados se encuentran en la Tabla 1.

TABLA 1.

Crecimiento y producción de PHB por la cepa A. chroococcum PHA y A. chroococcum H23 en medios de cultivo adicionados de 0,5% de glucosa.

	A. chroococcum PHA Tiempo (h)			A. chroococcum H23 Tiempo (h)		
	24	48	72	24	48	72
<i>Con 15 mM Acet.NH₄</i>						
Peso seco cel. g/l	2.1	2.4	2.7	2.2	2.6	2.8
Contenido en PHB %	78	86	78	26	29	31
<i>Sin acetato NH₄</i>						
Peso seco cel. g/l	0.7	2.2	2.7	0.8	2.3	2.6
Contenido en PHB %	60	95	76	12	19	23

Los medios se inocularon con cultivos de *A. chroococcum* PHA y *A. chroococcum* H23 y el proceso fermentativo se realizó aeróbicamente y en sistema en batch.

Como se indica en la Tabla 1, la cepa mutante hiperproductora PHA, alcanzó porcentajes de producción superiores a la cepa salvaje, alcanzándose índices de rentabilidad carbono consumido/PHB producido muy satisfactorios. La presencia o no de NH_4^+ en el medio no parece afectar significativamente la producción de PHB.

Ejemplo 2

El procedimiento del Ejemplo 1 se utilizó en este caso sustituyendo la glucosa por almidón. Los resultados en este proceso se detallan en la Tabla 2.

TABLA 2

Crecimiento y producción de PHB por la cepa A. chroococcum PHA y A. vinelandii ATCC 53799, en medios de cultivo adicionados con 0,5% de almidón.

	A. chroococcum PHA Tiempo (h)				A. vinelandii ATCC 53799 Tiempo (h)			
	24	48	72	120	24	48	72	120
<i>Con 15 mM Acet.NH₄</i>								
Peso seco cel.g/l	0.5	1.9	2.4	1.7	0.5	0.5	0.5	7.0
Contenido en PHB%	40	80	94	74	40	49	56	05
<i>Sin acetato NH₄</i>								
Peso seco cel.g/l	0.3	0.3	0.4	0.6	0.4	0.3	0.5	9.0
Contenido en PHB%	1.8	86	82	33	47	74	51	64

ES 2 061 405 B1

Bajo estas condiciones de cultivo la presencia de 15 mM de acetato amónico determina un mayor crecimiento y producción de la cepa PHA, cuando se compara con la cepa ATCC 53799, la cual se desarrolla pobremente sobre almidón.

5 La cepa PHA a las 72 horas de cultivo en almidón presenta densidades celulares análogas a las observadas con glucosa, siendo su producción de PHB del 94%.

La cepa *A. vinelandii* ATCC 53799 ha sido descrita como hiperproductora de PHB por Page y Knosp⁴ Resulta, no obstante, evidente su menor capacidad de producción en relación a la cepa PHA.

10 Ejemplo 3

El procedimiento del Ejemplo 1 se utilizó en este caso sustituyendo la glucosa por 12% de alpechin y 15 mM de acetato amónico como condiciones para el cultivo. Los microorganismos utilizados en estos 15 procesos informativos fueron: *A. vinelandii* ATCC 53799 y *A. chroococcum* PHA.

TABLA 3

20 *Crecimiento y producción de PHB por la cepa A. chroococcum PHA y A. vinelandii ATCC 53799 en medios de cultivo adicionados con 12% de alpechin.*

Tiempo incubac.(h)	A. chroococcum PHA			A. vinelandii ATCC 53799		
	48	72	120	48	72	120
Peso seco cel.g/l	2.3	1.8	1.4	1.2	1.4	1.4
% PHB	19	52	51	10	22	29

35 La cepa *A. chroococcum* PHA alcanza rendimientos superiores al 50% de PHB de la masa celular, lo que representa valores análogos a cepas de *A. eutrophus* desarrolladas a nivel industrial sobre sustratos convencionales (glucosa y fructosa).

Ejemplo 4

40 Después de 18 - 24 horas de incubación de la cepa *A. chroococcum* PHA en el medio descrito en el Ejemplo 1 con 15 mM de acetato amónico se adicionaron a las mismas 10 mm de ácido propiónico, valérico o nonanoico. Transcurridas 24, 48, 72 y 120 horas de proceso fermentativo, se determinó el peso seco celular, el porcentaje de PHA y la composición 3HB - 3HV de los polímeros producidos, siendo no obstante máxima la concentración de PHA a las 48 horas. Todos estos análisis se encuentran en la Tabla 4. 45

TABLA 4

50 *Formación de copolímeros 3HB - 3HV por la cepa A. chroococcum PHA en medios con glucosa conteniendo n - alkanos a las 48 horas de incubación.*

Alkano	Peso seco g/l	% PHA	Contenido % HV	Contenido % HB
Ninguno	2.7	86	0	100
Propionato	2.4	59	5	95
Valerato	2.7	99	10	90
Nonanoato	2.6	71	0	100

ES 2 061 405 B1

La adición de los alkanos es coincidente con el comienzo intensivo de la síntesis de PHA, al mismo tiempo que comienza en el sistema una limitación de glucosa. Solo la adición del propionato y valerato determina la aparición de copolímeros.

5 Hemos determinado, como distintas concentraciones de propionato y de valerato modifican la relación 3HB - 3HV. Estas experiencias se muestran en las Tablas 5 y 6.

TABLA 5

10 *Formación de copolímeros 3HB - 3HV por la cepa A. chroococcum PHA en medios de cultivo conteniendo 0.50% de glucosa y propionato.*

Propionato en mM	Peso seco g/l	% PHA	Contenido % HV	Contenido % HB
0	2.7	86	0	100
10	2.4	59	5	95
20	2.8	54	6	94
30	3.0	53	5	95
40	2.7	47	5	95
50	2.1	50	4	96

TABLA 6

30 *Formación de copolímeros 3HB - 3HV por la cepa A. chroococcum PHA en medios de cultivo conteniendo 0.50% de glucosa y valerato.*

Valerato en mM	Peso seco g/l	% PHA	Contenido % HV	Contenido % HB
0	2.7	86	0	100
10	2.7	99	10	90
20	3.1	95	12	88
30	3.4	95	19	81
40	3.0	95	18	82
50	2.7	95	17	83

45 Las Tablas 5 y 6, muestran como se producen copolímeros plásticos 3HV - 3HB por *A. chroococcum* PHA en relaciones desde 4 - 96 a 19 - 81, simplemente adicionando, a un medio glucosado, propiónico o valérico a distintas concentraciones. Esta distinta proporción 3HV - 3HB, modifica de forma significativa propiedades físicas tan importantes como punto de fusión y la elasticidad de los plásticos generados y en consecuencia la aplicabilidad de los mismos.

50 Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de ponerlo en práctica, se hace constar, que todo cuanto no altere, cambie o modifique su principio fundamental, puede quedar sometido a variaciones de detalle.

ES 2 061 405 B1

Bibliografía

1. Anderson, A.J. and Dawes, E.A. 1990. Microbiol. Rev., 54:450 - 472.
- 5 2. Dawes, E.A. and Senior, P.J. 1973. Ada. Microb. Physiol., 10:135 - 266.
3. Jackson, F.A. and Dawes, E.A. 1976. J. Gen. Microbiol., 97:303 - 312.
- 10 4. Page, W.J. and Knosp, O. 1989. Appl. Environ. Microbiol., 55:1334 - 1339.
5. Howells, E.R. 1982. Chem. Ind., 8:508 - 511.
- 15 6. Byrom, D. 1987. Trends Biotechnol., 5:246 - 250.
7. Page, W.J. and Sadoff, H.L. 1976. J. Bacteriol., 125:1080 - 1087.
- 20 8. Martinez - Toledo, M.V. 1985. FEMS Microbiol. Ecol., 31:197 - 203.

25

30

35

40

45

50

55

60

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento microbiológico para la producción de polihidroxi - alcanosatos. Tanto homopolímeros (3HB, 3 hidroxibutírico) como copolímeros (3HB - 3HV, 3 hidroxibutírico - 3 hidroxivalérico), **caracterizado** porque como microorganismo se utiliza la cepa mutante Azotobacter chroococcuin PHA (CECT 4435).

2. cultivo biológicamente puro de un mutante de Azotobacter chroococcum contramarcado con las siglas CECT 4435, **caracterizado** por producir tanto homopolímeros (3HB) como copolímeros (3HB - 3HV).

3. Procedimiento microbiológico para la producción de polihidroxi - alcanosatos, tanto homopolímeros (3HB) como copolímeros (3HB - 3HV), **caracterizado** por la utilización de alpechín como sustrato carbonado.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

- ① ES 2 061 405
② N.º solicitud: 9300944
③ Fecha de presentación de la solicitud: **04.05.93**
④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.⁵: C12P 7/62, C12N 1/20, C08G 63/06 // (C12P 7/62, C12R 1:065)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO-A-9118944 (THE GOVERNORS OF THE UNIVERSITY OF ALBERTA)	
A	EP-A-431883 (IMPERIAL CHEMICAL INDUSTRIES)	
A	EP-A-396289 (IMPERIAL CHEMICAL INDUSTRIES)	

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

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe

26.10.94

Examinador

J. López Nieto

Página

1/1