

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(10) Número de Publicación Internacional
WO 2012/038572 A1

(43) Fecha de publicación internacional
29 de marzo de 2012 (29.03.2012)

PCT

- (51) Clasificación Internacional de Patentes:
C12N 9/04 (2006.01) *C12P 11/00* (2006.01)
C12P 7/62 (2006.01)
- (21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2011/070654
- (22) Fecha de presentación internacional:
20 de septiembre de 2011 (20.09.2011)
- (25) Idioma de presentación: español
- (26) Idioma de publicación: español
- (30) Datos relativos a la prioridad:
P201031401
21 de septiembre de 2010 (21.09.2010) ES
- (71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US): **CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC)** [ES/ES]; C/ Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES).
- (72) Inventores; e
- (75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): **FERNÁNDEZ ESCAPA, Isabel** [ES/ES]; Centro De Investigaciones Biológicas (CIB), C/ Ramiro de Maeztu, 9, E-28040 Madrid (ES). **MORALES RUIZ, M^a del Valle** [ES/ES]; Centro De Investigaciones Biológicas (CIB), C/ Ramiro de Maeztu, 9, E-28040 Madrid (ES). **GARCÍA LÓPEZ, José Luis** [ES/ES]; Centro De Investigaciones Biológicas (CIB), C/ Ramiro de Maeztu, 9, E-28040 Madrid (ES). **PRIETO JIMÉNEZ, M^a Auxiliadora** [ES/ES]; Centro De Investigaciones Biológicas (CIB), C/ Ramiro de Maeztu, 9, E-28040 Madrid (ES).
- (74) Mandatario: **PONS ARIÑO, Ángel**; Glorieta de Rubén Darío, 4, E-28010 Madrid (ES).
- (81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Publicada:
- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
 - antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones (Regla 48.2(h))
 - con la parte de lista de secuencias de la descripción (Regla 5.2(a))

(54) Title: SYNTHESIS OF POLYHYDROXYALKANOATES (PHA) WITH THIOESTER GROUPS IN THE SIDE CHAIN

(54) Título : SÍNTESIS DE POLIHIDROXIALCANOATOS (PHA) CON GRUPOS TIOESTERES EN LA CADENA LATERAL

(57) Abstract: The invention relates to a method for the synthesis of polyhydroxyalkanoates (PHA), to the resulting PHAs, and to the use of said PHAs. The PHAs of the invention, known as PHACOS, have a novel monomer composition, since they contain monomers with thioester groups in the side chain that confer thereon novel physical chemical properties and allow the subsequent chemical modification thereof.

(57) Resumen: La presente invención se refiere a un proceso de síntesis de polihidroxialcanoatos (PHA), a los PHA obtenidos mediante este proceso y al uso de dichos PHA. Los PHA de la presente invención, denominados PHACOS, tienen una composición monomérica nueva, ya que contienen monómeros con grupos tioéster en la cadena lateral que les confieren nuevas propiedades físico-químicas y permiten su posterior modificación química.



WO 2012/038572 A1

SÍNTESIS DE POLIHIDROXIALCANOATOS (PHA) CON GRUPOS TIOÉSTERES EN LA CADENA LATERAL

La presente invención se refiere a un nuevo proceso para la síntesis de polihidroxicanoatos (PHA) y a los PHA obtenidos mediante dicho proceso. Además, la presente invención se refiere al uso de dichos PHA. Por tanto, la presente invención pertenece al campo de la Biotecnología Medioambiental, al de la Microbiología y al de los Biopolímeros.

10 ESTADO DE LA TÉCNICA

Los polihidroxicanoatos (PHA), conocidos comúnmente como “bioplásticos”, son polímeros biodegradables producidos por ciertas bacterias, que se acumulan en el interior celular en forma de gránulos de reserva de fuente de carbono cuando las condiciones de cultivo no son óptimas para el crecimiento (Madison y Huisman, 1999. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 63: 21-53). Estos biopolímeros son biodegradables y las bacterias los sintetizan a partir de fuentes renovables como por ejemplo la glucosa, la fructosa o los ácidos grasos que forman parte de los aceites vegetales. Por tanto, se puede definir el término bioplástico como biopolímero sintetizado a partir de fuentes renovables, que puede ser biodegradado en condiciones controladas y que presenta características físico-químicas similares a las de los plásticos derivados de la industria petroquímica (Sarasa *et al.*, 2009. *Bioresour. Technol.* 100: 3764–3768).

En general, los gránulos de PHA están compuestos por un poliéster (93-97% del peso seco del gránulo (PSG)) rodeado por fosfolípidos (1-6% del PSG) y proteínas asociadas al gránulo (GAP, del inglés “*Granule associated proteins*”) (1-2% del PSG), las cuales forman una fina capa en la superficie del gránulo. Hasta el momento se han definido tres clases de GAP en bacterias: i) las PHA sintetasas, involucradas en la polimerización del PHA, ii) las PHA despolimerasas, responsables de la degradación del bioplástico y iii) las

fasinas, las GAPs más abundantes, con una función estructural o reguladora (Prieto *et al.* 1999a. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65: 3265-3271; Moldes *et al.*, 2004. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70: 3205-3212).

- 5 Los PHA se clasifican en dos tipos principales de acuerdo a su estructura química: los PHA de cadena corta (scl-PHA, del inglés “*short chain length PHA*”) obtenidos a partir de monómeros con 4 ó 5 átomos de carbono y los de cadena media (mcl-PHAs del inglés “*medium chain length PHA*”) procedentes de monómeros con entre 6 y 14 átomos de carbono. Los diferentes PHA
10 identificados hasta la fecha son polímeros lineales compuestos de 3-hidroxiácidos grasos exclusivamente de la configuración *R* (RHA). El peso molecular de estos polímeros varía entre 50.000-1.000.000 y su diversidad radica en las sustituciones en el carbono asimétrico en posición 3, que le confiere al polímero el carácter quiral (Prieto *et al.*, 1999 *J. Bacteriol.* 181: 858-
15 868).

Es conocido que la composición del polímero depende de la fuente de carbono presente en el medio de cultivo utilizado durante la fermentación de la bacteria productora (Durner, *et al.*, 2001. *Biotechnol. Bioeng.*, 72: 278-288, Jung *et al.*,
20 2001. *Biotechnol. Bioeng.*, 72: 19-24). Por otra parte, es importante resaltar que las características físico-químicas de los polímeros varían según la naturaleza química de los monómeros que los componen (Kessler *et al.*, 2001. *J. Biotechnol.*, 86: 97-104). Teniendo en cuenta que se han descrito más de 140 RHA diferentes como componentes de los PHA producidos por bacterias
25 (Steinbüchel *et al.*, 1995. *Can. J. Microbiol.*, 41: 94-105), y que el biopolímero después de su obtención por fermentación puede ser sometido a posteriores modificaciones químicas, tales como el entrecruzamiento y a la adición de grupos funcionales (Lageveen *et al.*, 1988. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54: 2924-2932.), es fácil imaginar la gran diversidad de bioplásticos y RHA diferentes
30 que pueden generarse mediante la combinación de todos estos procesos.

Dado que los PHA son biopoliésteres bacterianos no tóxicos, biodegradables y biocompatibles producidos por una amplia gama de bacterias, incluyendo *Pseudomonas (P.)*, estos compuestos tienen mucho potencial en aplicaciones biomédicas y farmacéuticas, debido a su posible uso como biomateriales y a su aplicación en sistemas de liberación controlada de fármacos y en la ingeniería de tejidos. Los PHA también han atraído considerable atención debido a su potencial uso como fuentes de monómeros quirales o sintones, que son de gran utilidad como precursores en la industria farmacéutica, ya que son difíciles de conseguir en estado puro mediante los procesos químicos convencionales.

5 Las propiedades físico-químicas de los PHA abarcan desde rígido y cristalino a lo flexible, amorfo y elastomérico, en función de su composición monómerica y de la longitud de la cadena lateral del polímero.

Se han descrito muchos PHA con grupos funcionales en sus cadenas laterales, tales como bromo, cloro, flúor, un grupo alquilo ramificado, un grupo ciano, un grupo hidroxilo, un grupo alcoxi, un grupo acetoxi, un grupo epoxi, un grupo ciclohexilo, un grupo feniltio y un grupo propiltio (Kim *et al.*, 2007. *The Journal of Microbiology*. 45, 2, 87-97). Estos dos últimos son los únicos ejemplos de PHA que contienen azufre en la cadena lateral. Los PHA con un grupo tiofenoxi en la cadena lateral se obtuvieron de *P. putida* 27N01 empleando ácido 11-tiofenoxi-undecanoico como única fuente de carbono (Takagi *et al.*, 1999. *Macromolecules* 32, 8315-18). Los PHA con un grupo propiltio en su cadena lateral se componen de monómeros de ácido hydroxipropiltioalcanoico. También se han sintetizado PHA que contienen tioéteres en la cadena lateral mediante una cepa recombinante de *Ralstonia eutropha* mutante para la producción de polihidroxi-butirato y para expresar la enzima PHA sintasa de *P. mendocina*, empleando como sustrato ácido propiltiooctanoico o ácido propiltiohexanoico (Ewering *et al.*, 2002. *Microbiology* 148, 1397-1406). Esta cepa sintetiza a partir de ácido propiltiooctanoico el terpoliéster compuesto por ácido 3-hidroxi-propiltiobutírico, ácido 3-hidroxi-propiltiohexanoico y ácido 3-hidroxi-propiltiooctanoico, y a partir del ácido propiltiohexanoico, sintetiza el poliéster de 3-hidroxi-propiltiobutírico y ácido 3-hidroxi-propiltiohexanoico. Todos

estos PHA contienen grupos tioéter en las cadenas laterales, pero no se conocen PHA que contengan tioésteres en la cadena lateral.

La síntesis de nuevos PHA sigue siendo de gran interés ya que los nuevos biopolímeros, así como los monómeros que los componen, con nuevas propiedades físico-químicas, tienen potencialmente una enorme utilidad para la industria.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

10

La presente invención se refiere a un proceso de síntesis de polihidroxicanoatos (PHA), a los PHA obtenidos mediante este proceso y al uso de dichos PHA. Los PHA de la presente invención, denominados PHACOS, tienen una composición monomérica nueva, ya que contienen monómeros con grupos tioéster en la cadena lateral que les confieren nuevas propiedades físico-químicas, como por ejemplo (i) una elevada constante de transición vítrea respecto a los PHA convencionales, (ii) una carencia de punto de fusión, ya que son completamente amorfos, y (iii) que permiten su posterior modificación química. El grupo tioéster en la cadena lateral de los PHACOS supone la ventaja de que facilita su modificación química, lo cual implica que el PHA modificado tendrá unas nuevas propiedades, que proporcionan nuevas aplicaciones y/o mejoras en las mismas. Por ejemplo, el grupo tioéster de la cadena lateral permite la unión de los PHACOS a péptidos u otras moléculas.

25

Los monómeros de los PHACOS son ácidos (*R*)-3-hidroxi-aciltioalcanoicos, como el ácido (*R*)-3-hidroxi-6-aciltiohexanoico o el (*R*)-3-hidroxi-4-aciltiobutanoico. Estos monómeros pueden ser fácilmente modificados químicamente, por lo que son muy valiosos para su uso en la industria farmacéutica como sintones. La presente invención describe también un método de obtención de estos (*R*)-3-hidroxi-aciltioalcanoicos enantiopuros, a partir de los PHACOS.

30

Por tanto, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para la síntesis de polihidroxicanoatos (PHA) que implica cultivar una célula capaz de producir PHA en un sustrato, donde dicho sustrato comprende al menos un compuesto alifático funcionalizado con un grupo

5 tioéster.

La célula puede ser, pero sin limitarse, una célula vegetal, una levadura o una bacteria. La célula vegetal o la levadura pueden estar modificadas genéticamente, es decir, pueden ser células recombinantes.

10

Preferiblemente, la célula es una bacteria. Una bacteria es un organismo cuya especie pertenece al Reino *Bacteria*. Preferiblemente, la bacteria pertenece al género *Pseudomonas*. Una bacteria del género *Pseudomonas* pertenece a la familia *Pseudomonadaceae*, al Orden *Pseudomonales*, a la Clase *Gammaproteobacteria*, al Filo *Proteobacteria* y al Reino *Bacteria*.

15

En una realización preferida del primer aspecto de la invención, la bacteria del género *Pseudomonas* se selecciona de la lista que comprende: *P. putida* KT2442, *P. putida* U, *P. oleovorans* GPo1, *P. putida* KT42FadB y *P. putida* U

20 Δ FadBA. Preferiblemente, la bacteria es *P. putida* KT42FadB. La cepa *P. putida* KT42FadB ha sido obtenida por los autores de la presente invención a partir de la cepa *P. putida* KT2442 como está descrito en el ejemplo 1 y en la figura 1 de esta memoria. Además, la cepa *P. putida* KT42FadB se encuentra depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con número de acceso

25 CECT 7772.

El término "sustrato", tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere al compuesto o a los compuestos que la célula va a emplear como reactivo o reactivos en el proceso de síntesis de los PHA.

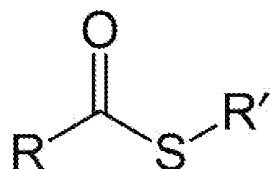
30

Un "compuesto alifático" es una molécula orgánica compuesta por carbono e hidrógeno, donde los enlaces C-C pueden ser simples, dobles o triples.

Preferiblemente, es una molécula orgánica lineal y/o ramificada de C₅-C₁₄. Un “compuesto alifático funcionalizado” es aquel en el que al menos un hidrógeno es sustituido por un grupo funcional. Un “grupo funcional” es un grupo de átomos específico dentro de una molécula que es responsable de la reacción o reacciones químicas que caracterizan a dicha molécula. Algunos ejemplos de grupos funcionales son un grupo éster, un grupo fenol, un grupo hidroxilo o un grupo amino. Se han descrito numerosos sustratos de carbono que contienen grupos funcionalizados y sirven como reactivos en la síntesis de PHA bacterianos, aunque ninguno con un grupo tioéster. Además, los monómeros que componen un PHA están determinados por los sustratos empleados en su síntesis, y hasta la fecha se han descrito más de 140 hidroxialcanoatos (Kim *et al.*, 2007. *The Journal of Microbiology*. 45; 2: 87-97). Los monómeros de PHA descritos hasta la fecha tienen estructuras muy variadas: lineales, ramificados, saturados, insaturados y aromáticos. La presencia de grupos funcionalizados tiene un interés especial ya que implica una variedad de propiedades físico-químicas, por ejemplo, mecánicas, importante, aparte de que algunos de estos grupos permiten modificaciones químicas. Además, dado que el uso directo de estos poliésteres es difícil debido, principalmente, a su carácter hidrofóbico, la presencia de grupos hidrofílicos en los PHA permite la obtención de polímeros anfífilicos capaces de formar micelas. Los copolímeros en bloque anfífilicos son potenciales espesantes, emulsionantes, dispersantes o espumantes.

Un tioéster es un compuesto con un grupo funcional tioéster, que se representa de la siguiente manera:

25



30

Donde: R y R' son independientemente dos grupos orgánicos iguales o diferentes. Un tioéster se forma por la esterificación entre un ácido carboxílico y un tiol.

En una realización preferida del primer aspecto de la invención, el compuesto alifático funcionalizado es un ácido aciltioalcanoico. Preferiblemente, el ácido aciltioalcanoico se selecciona de la lista que comprende los siguientes ácidos: 6-acetiltiohexanoico, 5-acetiltiopentanoico, 2,5-bis(acetilsulfanil)pentanoico, 4-
5 acetiltiolbutanoico, 3-acetilsulfanilbutanoico, 11-acetiltioundecanoico, 16-
acetilhiolhexadecanoico, 5-acetiltiooctanoico, 5-propanoyiltiooctanoico, 5-
butanoiltiooctanoico, 12-acetiltiododecanoico, 6-acetilsulfanil-8-
metilsulfaniloctanoico, 8-acetilsulfanil-6-sulfaniloctanoico, 5-(2-
metilpropanoilsulfanil)octanoico, 6,8-bis(acetilsulfanil)octanoico.
10 Preferiblemente, el compuesto alifático funcionalizado es el ácido 6-
acetiltiohexanoico (6-ATH).

En una realización preferida del primer aspecto de la invención, el sustrato además comprende un compuesto alifático que no necesariamente tiene que
15 estar funcionalizado con un grupo tioéster, sino que puede tener o no otro tipo
de grupos funcionales. Este compuesto alifático es capaz de inducir la síntesis
de PHA, por lo que mejora la eficiencia del cultivo y la capacidad de las células
de crecer y sintetizar PHA. Preferiblemente, el compuesto no está
funcionalizado con un grupo tioéster y es un ácido graso de entre 4 y 28
20 carbonos que puede estar funcionalizado con un grupo distinto del tioéster. El
ácido graso puede ser de cadena sencilla y puede también presentar enlaces
dobles o triples. El ácido graso además puede ser cualquiera de los sustratos
del grupo A descritos en Kim *et al.*, 2007. *The Journal of Microbiology*. 45, 2,
87-97. Preferiblemente, el ácido graso se selecciona de la lista que comprende
25 el ácido decanoico, el ácido nonanoico, y el ácido octanoico. Más
preferiblemente, este compuesto alifático es el ácido decanoico.

El término "inductor", tal y como se emplea en la presente memoria, hace
referencia a la capacidad de un sustrato para mejorar la síntesis de PHA.

30

En una realización preferida del primer aspecto de la invención, el sustrato comprende ácido decanoico y ácido 6-acetiltiohexanoico. Estos compuestos

pueden estar presentes en distintas proporciones. En una realización preferida del primer aspecto de la invención, el sustrato comprende una relación molar del compuesto alifático y compuesto alifático funcionalizado con un grupo tioéster de entre 1:9 a 9:1. Preferiblemente, la relación es de entre 1,1:8,9 y 2:8. Más preferiblemente, es de entre 1,5:8,5 y 1,8:8,2. En una realización más preferida del primer aspecto de la invención, el sustrato consiste en ácido decanoico 2,4 mM y ácido 6-acetiltiohexanoico 12 mM.

En una realización preferida del primer aspecto de la invención, el cultivo comprende una o dos fases de fermentación. Preferiblemente, comprende dos fases de fermentación. Preferiblemente, la segunda fase de fermentación tiene una duración de entre 5 y 30 horas. Más preferiblemente, la duración es de entre 7 y 26 horas. Aún más preferiblemente, la duración es de entre 8 y 25 horas. En la realización más preferida, la duración de la segunda fase es de 24 horas.

Una "fase de fermentación" se refiere a que el cultivo se realiza manteniendo durante toda la fermentación las mismas condiciones de cultivo, con un mismo medio y a la misma temperatura. Cuando se cultivan las células en dos fases de fermentación, se emplean unas condiciones de cultivo diferentes en la primera fase de fermentación y en la segunda fase de fermentación. Además, se entiende que en los cultivos que se realizan en dos fases de fermentación, una parte del cultivo o todo el cultivo que se produce en la primera fase de fermentación se utiliza como inóculo para el cultivo en la segunda fase de fermentación.

Un segundo aspecto de la invención se refiere a los PHA obtenidos mediante el procedimiento del primer aspecto de la invención. Estos PHA en adelante los denominamos PHACOS.

Un tercer aspecto de la invención se refiere a la cepa bacteriana de la especie *Pseudomonas putida* con número de acceso CECT 7772. La cepa *P. putida*

KT42FadB ha sido depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) el 21 de julio de 2010 y tiene el número de acceso CECT 7772. La dirección de dicha Autoridad Internacional de depósitos es: Universidad de Valencia / Edificio de investigación / Campus de Burjassot/ 46100 Burjassot (Valencia).

Las características de dicha cepa son:

- crece en medio rico LB (de "Luria Bertani" o "Lysogen Broth", medio número 48 de la lista de medios de la CECT, cuya composición es 10 g/l de triptona, 5 g/l de extracto de levadura y 10 g/l de NaCl en agua, a pH 7,0) suplementado con kanamicina 50 µg/ml.
- crece en agitación orbital a 300 rpm y a 30° C durante 14 horas.
- se conserva a -80° C con glicerol al 15 %.
- se trata de un mutante por inserción disruptiva con el plásmido pk18mob del gen *fadB* (PP_2136). Dicho plásmido posee un gen de resistencia a la kanamicina.

Un cuarto aspecto de la invención se refiere al uso de los PHACOS para la producción de materiales bioplásticos, tejidos, biomateriales, sistemas de liberación de fármacos, pegamentos o pinturas.

Un quinto aspecto de la invención se refiere al uso de los PHACOS para la obtención de ácidos (*R*)-3-hidroxi-acilalcanoicos enantiopuros. Preferiblemente, los ácidos (*R*)-hidroxi-acilalcanoicos enantiopuros se seleccionan de la lista que comprende: 3-hidroxi-6-acetilhexanoico, 3-hidroxi-4-acetilbutanoico, y los derivados hidroxilados de los ácidos 6-acetilhexanoico, 5-acetilpentanoico, 2,5-bis(acetilsulfanil)pentanoico, 4-acetilbutanoico, 3-acetilsulfanilbutanoico, 11-acetilundecanoico, 16-acetilhexadecanoico, 5-acetiloctanoico, 5-propanoyl octanoico, 5-butanoil octanoico, 12-acetildodecanoico, 6-acetilsulfanil-8-metilsulfaniloctanoico, 8-acetilsulfanil-6-sulfaniloctanoico, 5-(2-metilpropanoil sulfanil) octanoico, 6,8-bis(acetilsulfanil) octanoico.

El término "enantiopuro" tal y como se emplea en la presente memoria, se refiere a que los compuestos, en este caso los ácidos (*R*)-3-hidroxi-aciltioalcanoicos, se presentan únicamente en una forma enantiomérica específica.

5

Los derivados hidroxilados de los ácidos (*R*)-3-hidroxi-aciltioalcanoicos son aquellos ácidos que llevan al menos un grupo hidroxilo.

Un sexto aspecto de la invención se refiere a un procedimiento para la obtención de ácidos (*R*)-3-hidroxi-aciltioalcanoicos enantiopuros que comprende la hidrólisis de los PHACOS. La hidrólisis de los PHACOS puede llevarse a cabo con cualquiera de los métodos conocidos en el estado de la técnica. Preferiblemente, la hidrólisis es química. Preferiblemente, la hidrólisis es enzimática. Más preferiblemente, la hidrólisis la lleva a cabo una enzima depolimerasa. Preferiblemente, la enzima depolimerasa es PhaZ. La depolimerasa PhaZ es capaz de hidrolizar gránulos de PHA que contienen monómeros tanto alifáticos como aromáticos (de Eugenio *et al.*, 2007. The Journal of Biological Chemistry. 282; 7: 4951-62).

15

Un séptimo aspecto de la invención se refiere a los ácidos (*R*)-3-hidroxi-aciltioalcanoicos enantiopuros obtenidos mediante el procedimiento del quinto aspecto de la invención. Estos compuestos son de gran utilidad en la industria farmacéutica y/o química para su uso como sintones.

20

Una realización de la invención es un procedimiento para la síntesis de PHA donde se cultiva *P. putida* KT42FadB en un medio de cultivo con ácido decanoico 2,4 mM como inductor y ácido 6-acetiltiohexanoico 12 mM como compuesto funcionalizado, en dos fases de fermentación, teniendo al segunda fase una duración de 24 horas.

25

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos,

30

componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Fig. 1. Esquema de la construcción de la cepa *P. putida* KT42FadB empleando el plásmido pK18mob. El plásmido tiene el promotor del gen lacZ (Plac), un sitio de multiclonación (MCS), el gen alfa-lacZ y un gen de resistencia a kanamicina (km^R). Entre las dianas de la enzima de restricción *Sma*I se inserta parte del gen *fadB*. La enzima de restricción *Sph*I permite conocer la orientación del inserto. La recombinación homóloga permite la inserción del plásmido dentro del gen *fadB* de *P. putida* KT2442 para generar así al cepa KT42FadB.

Fig. 2. Crecimiento de *P. putida* KT2442 y *P. putida* KT42FadB en placas de agar con medio mínimo M63 0,1N con octanoato sódico 15mM. La cepa original sí crece pero la cepa mutante no es capaz de hacerlo en este medio.

Fig. 3. Curvas de crecimiento de las cepas de *P. putida* KT2442 y KT42FadB en presencia de ácido decanoico 12mM en una estrategia de fermentación en dos fases.

Fig. 4. Contenido en PHA y composición monomérica de cultivos de *P. putida* KT2442 (KT) y KT42FadB (FadB) creciendo en presencia de ácido decanoico 12mM en una estrategia de fermentación en dos fases en medio líquido, a distintos tiempos (5, 10, 15, 20, 25, 30 y 90 horas). OH-C6 es ácido hidroxihexanoico, OH-C8 es ácido hidroxiocetanoico. OH-C10 es ácido hidroxidecanoico.

Fig. 5. Curvas de crecimiento de las cepas de *P. putida* KT2442 y KT42FadB creciendo en una estrategia de fermentación en dos fases en presencia de: 6-ATH 15 mM como única fuente de carbono (Δ); 6-ATH 12mM como fuente de

carbono y ácido decanoico 2,4 mM como inductor (○); ácido decanoico 2,4 mM a la concentración de inducción ().

Fig. 6. Análisis obtenido por GC-MS de los ésteres metílicos de 3-hidroxihexanoato (pico 1), 3-hidroxi octanoato (pico 3), 3-hidroxidecanoato (pico 4) y 3-hidroxi-6-acetilthiohexanoato (pico 5) en *P. putida* KT42FadB usando como fuente de carbono: (A) ácido decanoico 12 mM y (B) 6-ATH 12 mM como fuente de carbono y ácido decanoico 2,4 mM como inductor. El pico 2 corresponde al 3-metilbenzoato, usado como patrón interno.

Fig. 7. Espectro 1H NMR del polímero aislado de la cepa *P. putida* KT2442.

10 **Fig. 8.** Espectro 1H NMR del polímero aislado de la cepa *P. putida* KT42FadB.

Fig. 9. Termograma TGA de las muestras de polímero aislado de las cepas *P. putida* KT2442 y *P. putida* KT42FadB. Se representa el % en peso frente a la temperatura.

15 **Fig. 10.** Termograma TGA de las muestras de polímero aislado de las cepas *P. putida* KT2442 y *P. putida* KT42FadB. Se representa el flujo de calor frente a la temperatura.

EJEMPLOS

20 A continuación se ilustrará el proceso de síntesis de los PHA de la invención.

EJEMPLO 1: Estudio del fenotipo de la cepa mutante *P. putida* KT42FadB en cuanto a su capacidad para metabolizar ácidos grasos y transformarlos en PHA utilizando precursores alifáticos.

25 Para analizar el fenotipo de la cepa mutante *P. putida* KT42FadB en cuanto a su deficiencia para utilizar ácidos grasos como fuente de carbono, esta cepa se cultivó primeramente en placas de medio óptimo para la producción de PHA en *P. putida* KT2442 (medio M63 0,1N con 15 mM de ácido octanoico). Como se muestra en la Figura 2, *P. putida* KT42FadB no fue capaz de crecer en placas de agar de este medio, ya que la mutación en el gen *fadB* le impide utilizar
30 ácido octanoico como fuente de carbono y energía debido a la deficiencia en la

producción del complejo enzimático FadAB. Esto confirmó el fenotipo de la interrupción de la ruta de la beta-oxidación de ácidos grasos en este mutante.

También hemos estudiado el crecimiento y la capacidad de producción de PHA
5 utilizando precursores de PHA no relacionados con los ácidos grasos en la
cepa *P. putida* KT42FadB, comparándola con la estirpe salvaje. Ambas cepas
de *P. putida* muestran perfiles de crecimiento similares y son capaces de
formar gránulos de PHA cuando se cultivaron en un solo paso de fermentación.
Usando ya sea medios ricos como LB, o medios mínimos limitados en
10 nitrógeno con diversas fuentes de carbono, como M63 0,1N glucosa 20 mM, ó
M63 0,1N succinato 30 mM, no hemos observado ninguna diferencia evidente
entre la cepa salvaje y el mutante KT42FadB en términos de producción de
PHA, que fue baja en todos los casos (entre el 15-20% del peso seco). Estos
resultados están de acuerdo con una mutación en el complejo de la beta-
15 oxidación que afecta al crecimiento de la cepa mutante sólo cuando utiliza
ácidos grasos como fuente de carbono, pero no cuando las células son
fermentadas con fuentes de carbono diferentes a los ácidos grasos.

Cepas, Medios y Condiciones de Cultivo

20

En la Tabla 1 se muestran las cepas bacterianas utilizadas en este estudio. Las
cepas de *E. coli* y *P. putida* se cultivaron en medio LB a 37° C y 30° C,
respectivamente. Como antibiótico de selección se empleó kanamicina (50
µg/ml). Las cepas de *P. putida* se cultivaron también en M63 0,1 N (13,6 g/l
25 KH₂PO₄, 0,2 g/l (NH₄)₂SO₄, 0,5 mg/l FeSO₄·7 H₂O, ajustado a pH 7,0 con
KOH), un medio mínimo limitado en su contenido en nitrógeno, a una
temperatura de 30° C y agitación a 250 rpm tal y como se ha descrito
previamente (Moldes C *et al.*, 2004. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 3205). Este
medio fue suplementado con MgSO₄ 1 mM y una solución de elementos traza
30 (composición ×1.000: 2,78 g/l FeSO₄·7H₂O, 1,98 g/l MnCl₂·4H₂O, 2,81 g/l
CoSO₄·7H₂O, 1,47 g/l CaCl₂·2H₂O, 0,17 g/l CuCl₂·2H₂O, 0,29 g/l ZnSO₄·7H₂O).
Como fuentes de carbono se utilizaron glucosa 20 mM, succinato 30 mM,

octanoato sódico 15 mM, ácido decanoico 12 mM y ácido 6-acetilthiohexanoico (6-ATH) 15 mM, o mezclas de ellos (en la proporción indicada en cada experimento). El crecimiento fue monitorizado con un espectrofotómetro Shimadzu UV-260 a 600 nm. Los medios sólidos se suplementaron con un 1,5% (peso/vol) de agar.

Tabla 1. Cepas bacterianas empleadas.

Cepas	Origen o Uso
<i>Pseudomonas putida</i> KT2442	<i>hsdMR</i> . Cepa derivada de la cepa parental KT2440
<i>Pseudomonas putida</i> KT42FadB	Δ <i>fadB</i> ::pK18 <i>mob</i>
<i>Escherichia coli</i> DH10B	Huésped para plásmidos y vector donador en la conjugación
<i>Escherichia coli</i> HB101 (pRK600)	Usada como cepa auxiliar o “ <i>helper</i> ” en la conjugación triparental

El crecimiento de *P. putida* KT2442 y la cepa mutante KT42FadB también se realizó en un procedimiento en dos fases. Preinóculos de cada una de estas cepas en medio LB fueron ajustados a una densidad óptica a 600 nm (OD_{600}) de 0,3. Después de 16 horas de incubación en LB, las células se recogieron y se diluyeron 1:2 en medio M63 0,1N suplementado con la fuente de carbono seleccionada. Esta segunda etapa del crecimiento en medio mínimo también se realizó en placas de 96 pocillos. Para ello, se distribuyeron en las placas multipocillo alícuotas de 200 μ l de dichos cultivos. Las placas se incubaron a 30° C durante entre 24 y 48 horas, con 20 segundos de agitación orbital intensa cada 15 minutos. En las curvas de crecimiento se muestran los valores promedio de al menos 10 repeticiones (Figuras 3 y 5).

20

Manipulaciones del ADN y Construcciones de Plásmidos

Las manipulaciones genéticas y demás técnicas de biología molecular se realizaron esencialmente según lo descrito previamente (Sambrook J. y Russell D. W. 2001., *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.*). Para la construcción del mutante *P. putida* KT42FadB un fragmento interno de 5 707 pares de bases del gen *fadB* fue clonado en el plásmido pK18*mob* utilizando los cebadores: sentido (SEQ ID NO: 1) 5' TCCCCCGGGAAAAGCTCAAGCTCAATGCCAT 3' y antisentido (SEQ ID NO: 2) 5' TCCCCCGGGTTGAAGAAGTGCATGCC 3'. Los productos de la reacción de amplificación en cadena de la polimerasa (PCR) resultantes, y el plásmido 10 pK18*mob* (Schafer, A *et al.* 1994. *Gene* 145:69-73) fueron digeridos con *Sma*I y a continuación ligados. La mezcla de ligación se transformó en células de *E. coli* DH10B competentes. Se seleccionaron dos plásmidos por alfa-complementación que difieren entre sí en la orientación del promotor *Plac* respecto al fragmento interno del gen *fadB*. El plásmido pK18FadB1, que porta 15 el promotor *Plac* con una orientación opuesta a la del fragmento interno al gen *fadB*, fue introducido en la cepa *P. putida* KT2442 mediante conjugación triparental. La correcta inserción del plásmido pK18FadB1 en el gen *fadB* del genoma de *P. putida* KT2442 se analizó por medio de PCR (Figura 1).

20 Purificación de los polímeros de PHA

Después de 24 horas de incubación los cultivos en segunda fase en medio M63 0,1 N fueron recogidos por centrifugación y resuspendidos en solución salina. Para romper las células se pasaron por la prensa de French dos veces. La 25 solución se centrifugó a 15.000 × g durante 30 minutos y el precipitado se disolvió en 10 ml de cloroformo. Para extraer los compuestos solubles en agua, se añadieron 2 ml de agua y se mezclaron las fases acuosa y orgánica por agitación, tras lo cual se separaron mediante centrifugación a 5.000 × g. La fase orgánica (inferior) se transfirió a otro tubo y el procedimiento se repitió 30 añadiendo 10 ml de cloroformo a la fase acuosa. La fase orgánica se precipitó en 10 volúmenes de metanol frío agitado con varilla magnética. Tras decantar la mezcla metanol/cloroformo, el polímero resultante se resuspendió en

cloroformo y se secó durante la noche. Los polímeros resultantes se almacenaron a temperatura ambiente.

EJEMPLO 2: Producción de PHA en la cepa mutante mediante una estrategia de fermentación en dos fases.

La cepa *P. putida* KT42FadB mutante no es capaz de utilizar los ácidos grasos como única fuente de carbono, y por tanto, es incapaz de producir PHA de manera eficaz a partir de estos precursores cuando crece en una sola fase en medio líquido. La cepa salvaje produce 1 mg/ml de biomasa cuando se cultiva en ácido decanoico 12 mM como fuente de crecimiento y precursor de PHA, mientras que el mutante KT42FadB sólo produce 0,34 mg/ml de biomasa celular.

Hemos desarrollado una estrategia consistente en dos pasos de fermentación con el fin de comparar la capacidad del mutante y de la cepa silvestre para producir PHA. En una primera fase las células se cultivaron durante la noche en medio rico LB. Después de recolectar las células mediante centrifugación, se diluyeron 1:2 veces en medio fresco M63 0,1N suplementado con 12 mM de ácido decanoico como precursor de PHA. Esta segunda fase, o fase de acumulación de PHA, se realizó en placas multipocillo con el fin de analizar la densidad óptica a 630 nm de los cultivos a lo largo del tiempo de forma comparada. Después de entre 7 y 8 horas de incubación en placas de multipocillo, la densidad óptica de los cultivos de la cepa mutante KT42FadB aumentó significativamente en comparación con la de la cepa de tipo salvaje (Figura 3). Dado que la turbidimetría celular se altera por la acumulación de gránulos de PHA (de Eugenio *et al.*, 2010. *Environ. Microbiol.* 12: 207-21), estos resultados suponen que la estirpe mutante presenta un incremento en la producción de PHA con respecto a la salvaje.

30

El contenido celular y la composición del PHA se han determinado por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) en

sedimentos secos (deshidratados), obtenidos a partir de las células de *P. putida* KT2442 y KT42FadB tras el segundo paso de la fermentación. Cuando el ácido decanoico 12 mM se utiliza como precursor de PHA, la cepa de *P. putida* KT42FadB es capaz de acumular mayor concentración de PHA que la cepa salvaje y con una composición monomérica diferente (Figura 4). La falta del complejo enzimático FadAB produce una acumulación de intermediarios metabólicos (R)-3-hidroxiacil-CoA dentro de la célula, que se canalizan a la producción de PHA en lugar de seguir la ruta catabólica de la beta-oxidación. En el PHA producido en la cepa mutante existe una pequeña proporción de monómeros con cadenas laterales más cortas, es decir, que han sufrido un proceso catabólico de beta-oxidación, lo que sugiere la presencia de vías alternativas de beta-oxidación codificadas en el genoma de *P. putida* KT2442.

EJEMPLO 3: Acumulación de PHACOS en *P. putida* KT42FadB y en la cepa salvaje a partir de precursores funcionalizados con grupos tioésteres.

La síntesis de PHA funcionalizados con grupos tioéster en la cadena lateral (PHACOS) se comparó en las cepas salvaje y mutante KT42FadB en términos de DO_{630} cuando se cultivaron en placas multipocillo. El ácido 6-acetiltiohexanoico (6-ATH) fue elegido como precursor funcionalizado debido a la reactividad del grupo tioéster en la cadena lateral, como muestran las estructuras químicas identificadas en los poliésteres PHACOS detalladas más abajo. Las condiciones óptimas de crecimiento para la producción de este PHA funcionalizado se establecieron con ácido decanoico como cosustrato (6-ATH 12 mM como fuente de carbono y ácido decanoico 2,4 mM como inductor) en un cultivo de fermentación en dos etapas. En estas condiciones, el mutante KT42FadB muestra mayores valores de turbidimetría después de 24 horas respecto a los detectados en la cepa salvaje (Figura 5). Cuando se utiliza únicamente el ácido decanoico, en una concentración de cosustrato (2,4 mM) la absorbancia a 630 nm aumenta significativamente hasta las 7 u 8 horas de la segunda fase, y después disminuye. El perfil turbidimétrico que se observa

cuando las células se incuban en presencia de 6-ATH 12 mM y ácido decanoico 2,4 mM comparado con el detectado al añadir únicamente el ácido decanoico 2,4 mM es completamente diferente. Estos resultados demuestran que *P. putida* KT2442, y en un mayor grado *P. putida* KT42FadB, son capaces de metabolizar las moléculas de 6-ATH, pero sólo en presencia de un cosustrato como por ejemplo el ácido decanoico.

Hemos analizado la producción de biomasa y PHACOS en ambas cepas tras 24 horas de la fase de acumulación en presencia de 6-ATH 12 mM y ácido decanoico 2,4 mM. En estas condiciones la biomasa alcanzada por ambas cepas es similar: 0,9 mg/ml en la cepa salvaje y 1,2 mg/ml en la cepa mutante KT42FadB. Las cepas salvaje y mutante producen, respectivamente, 0,05 mg/ml y 0,22 mg/ml de PHACOS en relación al peso seco. Cuando las bacterias se cultivan en una sola fase de crecimiento en presencia de 6-ATH 12 mM y ácido decanoico 2,4 mM, la biomasa de las cepas salvaje es de 0,65 mg/ml y 0,37 mg/ml. La cepa salvaje y la cepa mutante producen respectivamente 0,11 mg/ml y 0,09 mg/ml de PHACOS.

EJEMPLO 4: Composición del polímero PHACOS.

La Figura 6 muestra el total de iones resultantes por GC-MS de cada éster metílico obtenido a partir de los polímeros de la bacteria *P. putida* KT42FadB, cuando se cultivan en dos fases. Como muestra la figura, cada polímero contiene ácidos 3-hidroxi-alcanoicos (octanoico, decanoico y trazas de hexanoico), así como monómeros derivados del 6-ATH cuando este es utilizado como precursor en el crecimiento de las bacterias.

La cuantificación de monómeros 3-hidroxi-alcanoicos se basó en las señales relativas obtenidas entre los patrones, consistentes en los respectivos ácidos grasos sin grupo hidroxilo, y el patrón interno utilizado en este estudio, el 3-metil-benzoato. Para la cuantificación del metiléster del 3-hidroxi-6-acetil-tiohexanoato fue utilizado como patrón el 6-ATH. La concentración de cada

monómero se obtuvo mediante el cálculo relativo del factor de respuesta, que es una relación del área obtenida de cada compuesto y del patrón interno a partir del cromatograma, así como de la concentración del patrón y de patrón interno utilizado. Se sabe que las bacterias son capaces de convertir parte del ácido decanoico en ácidos grasos más cortos (ácidos octanoico y hexanoico) como paso previo a su incorporación en el polímero. De igual forma se sospecha que la bacteria podría cortar la cadena lateral de 6-ATH para incorporar un monómero con dos carbonos menos en el polímero. Debido a la falta de patrones para los monómeros hidroxilados derivados del 6-ATH, la proporción de éstos en el polímero se determinó de forma precisa mediante resonancia magnética nuclear (RMN).

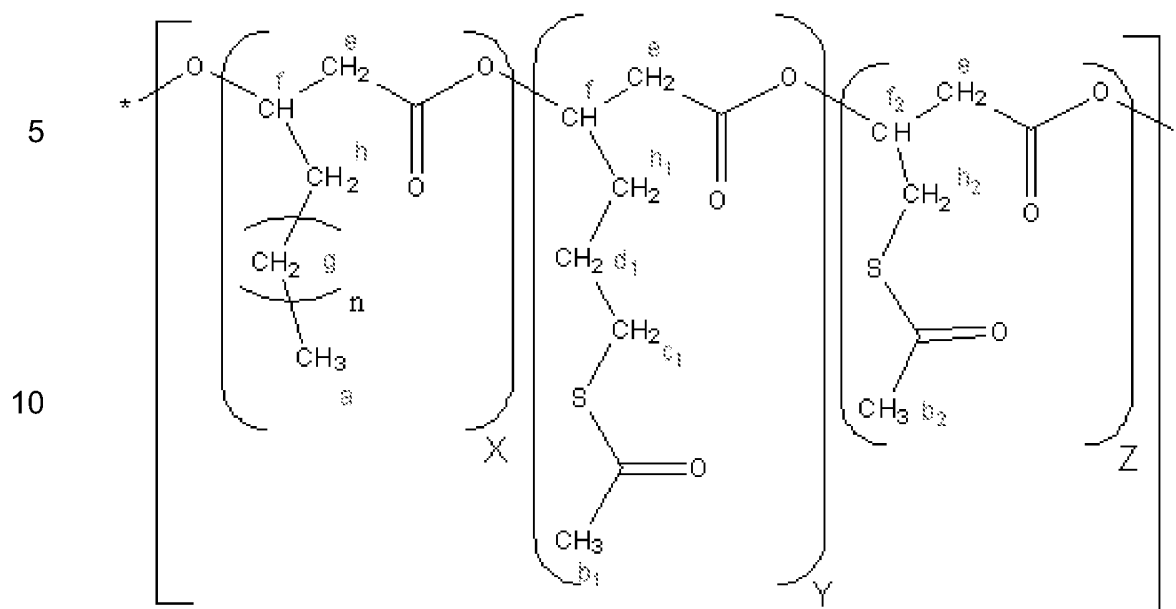
Vale la pena señalar que la RMN no se puede aplicar para una rápida determinación estructural de los monómeros no funcionalizados del PHA, ya que el patrón del desplazamiento químico es tan complicado que los cambios químicos de monómeros presentes en el poliéster no pueden determinarse fácilmente. Por esta razón, ambas técnicas, GC-MS y RMN, se han utilizado de forma complementaria para identificar y cuantificar cada monómero presente en los polímeros.

20

Tabla 2. Desplazamiento químico en partes por millón de todos los monómeros presentes en los PHA, analizados mediante RMN 1H.

Desplazamiento (ppm)	Protones
0,8	a
1,3	g
1,6	h +h ₁
1,7	d ₁
2,3	b ₁ +b ₂
2,5	e
2,8	c ₁
3,2-3,3	h ₂
5,2	f
5,3	f ₂

Las estructuras químicas identificadas en los poliésteres PHACOS son las siguientes:



15 Las Figuras 7 y 8 muestran los espectros de RMN de los PHACOS producidos por la estirpe mutante y la estirpe salvaje, mientras que en la Tabla 2 se muestran los desplazamientos químicos de los protones señalados (a, b₁, b₂, etc.) en las estructuras químicas mostradas arriba.

20 Determinación de la composición monomérica

Cabe señalar que el polímero obtenido de la bacteria mutante presenta un porcentaje de 3-hidroxi-6-ATH superior al observado en la estirpe salvaje. Las bacterias de tipo salvaje también tienen una mayor capacidad para metabolizar la molécula de 6-ATH, por lo que se observa menor proporción del monómero 3-hidroxi-4-acetiltiobutanoato. La Tabla 3 muestra un resumen de la composición monomérica de los PHACOS obtenidos a partir de la estirpe mutante y de la salvaje cuando se cultivan en dos fases. Para determinar la composición monomérica de los PHA se han empleado el análisis por GC-MS y

25

30 la RMN.

Tabla 3. Composición monomérica en % de los polímeros aislados a partir de las cepas de *P. putida* KT2442 y KT42FadB

Monómero	KT2442	KT42FadB
3-hidroxi-6-acetiltiohexanoato (%)	47	57,5
3-hidroxi-4-acetiltiobutanoato (%)	31,5	7,5
3-hidroxi-decanoato	7,1	19,1
3-hidroxi-octanoato	12,6	15,5
3-hidroxi-hexanoato	2,1	0,6

- 5 Para el análisis por GC-MS, los monómeros se obtuvieron por metanolisis ácida del poliéster o de las células enteras liofilizadas mediante la resuspensión de entre 3 y 6 mg en 2 ml de metanol acidificado con un 15% v/v de H₂SO₄ con 0,5 mg/ml de 3-metil-benzoato, empleado como patrón interno, y 2 ml de cloroformo. La mezcla se dispuso en tubos con tapón de rosca y se estos se
- 10 incubaron a 100° C durante 4 horas. Después de enfriar, se añadió 1 ml de agua destilada a la mezcla para inducir la separación de las fases. La fase orgánica que contiene los ésteres metílicos de los monómeros resultantes fue analizada por GC-MS. El equipo utilizado para este análisis fue un cromatógrafo de gases Agilent 7890A equipado con una columna HP 5 MS (30
- 15 m, 0,25 mm de diámetro interno y 0,25 mm de espesor de película) y un espectrómetro de masas Agilent 5975C. Se inyectó 1µl de la fase orgánica de cada muestra (con una relación de "split" de 1:50) con helio como gas portador, y la temperatura del horno se programó para mantenerse a 80° C durante 2 minutos y luego aumentar desde 15° C hasta 250° C para la eficiente
- 20 separación de los picos. La temperatura del inyector fue de 250° C. Los espectros se obtuvieron por impacto electrónico usándose una energía de ionización de 70 eV.

Por otro lado, los experimentos de RMN se realizaron en un aparato Bruker 400 MHz con una solución de muestra en CDCl_3 (cloroformo deuterado 20 mg/ml) a fin de determinar la relación entre cada monómero.

5 EJEMPLO 5: Caracterización física y térmica del polímero PHACOS.

Según los resultados de análisis termogravimétrico (TGA, atmósfera de aire, $10^\circ \text{C}/\text{minuto}$), los termogramas corroboran que todas las muestras tienen exclusivamente materia orgánica ya que no se detectaron agua ni residuos inorgánicos. El peso se mantuvo estable hasta 200°C para la muestra de PHACOS producida por la cepa salvaje y hasta 220°C para la muestra de PHACOS producida por la cepa mutante. A partir de estas temperaturas se llevó a cabo la degradación de los polímeros, con el máximo centrado en 270°C para la muestra de la cepa salvaje y en 264°C para la muestra de la estirpe mutante. Los residuos detectados a 700°C fueron de muy baja concentración y similares en ambas muestras.

Los ensayos de Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) mostraron que ambos poliésteres son amorfos. Se observó una constante de transición vítrea (T_g) de -7°C y -18°C para las muestras de las cepas salvaje y mutante, respectivamente. No se detectaron picos de fusión ni de cristalización cuando se calentaron y enfriaron las muestras a $10^\circ \text{C}/\text{minuto}$.

De acuerdo a la caracterización térmica de los poliésteres analizados en este trabajo, se observa que ambos presentan valores bajos de temperatura de transición vítrea T_g . Esto podría ser un indicador de una buena capacidad de procesado térmico, ya que los valores bajos de T_g sugieren que, a temperatura ambiente, los dos polímeros se comportan como polímeros amorfos y son relativamente blandos y deformables.

30

Tabla 4. Pesos moleculares y polidispersidad (PDI) de los polímeros aislados a partir de las cepas de *P. putida* KT2442 y KT42FadB.

	KT2442	KT42FadB
M_n (kDa)	71	99
M_w (kDa)	259	366
PDI	3,6	3,7

En cuanto a la determinación de los pesos moleculares, los resultados se muestran en la Tabla 4. Puede observarse que la muestra obtenida a partir del mutante KT42FadB tiene valores más altos de peso molecular promedio tanto en número (M_n) como en peso (M_w), lo que es indicativo de que la adición al poliéster de monómeros con grupo tioéster no inhibe el proceso de polimerización.

En cuanto a la polidispersidad (PDI) esta es mayor también en la cepa mutante, indicando mayor grado de variación en los pesos moleculares de este polímero.

Con los resultados que hemos obtenido, podemos decir que hemos sintetizado dos nuevos PHA hidrofílicos con grupos funcionales que tienen una alta susceptibilidad de ser químicamente modificados y con características térmicas que sugieren una gran facilidad de procesamiento.

Caracterización física y térmica

Los pesos moleculares de los poliésteres se determinaron por cromatografía de exclusión molecular (SEC). Las mediciones se realizaron con un cromatógrafo de líquidos Shimadzu (Japón) equipado con un detector de índice de refracción RID-10A y un detector UV diodo array SPD-M10A. El set de columnas utilizado estaba compuesto por una columna de 50 mm PLgel Guard de 5 μ m, dos columnas de 300 mm PLgel MIXED-C de 5 μ m y una columna de 300 mm PLgel 5 μ m-100 Å. La curva de calibrado se realizó con patrones de poliestireno desde 580 hasta $1,6 \times 10^6$ g/mol. Como fase móvil se utilizó cloroformo y los análisis se realizaron a 25° C a un flujo de 0,8 ml/minuto.

El TGA se realizó en un equipo TA Instruments TGA Q5000. Las muestras se calentaron desde temperatura ambiente hasta 700° C a razón de 10° C/minuto en atmósfera de aire. El TGA proporciona una medición cuantitativa de la variación en la masa de los poliésteres asociada con la transición y la degradación térmica.

En el caso de la DSC, las mediciones se realizaron en un equipo TA Instruments DSC 2910. Los materiales fueron expuestos a sucesivos ciclos térmicos de calor-frío-calor entre -90° C y 180° C a 10° C/minuto. La DSC se utilizó para determinar propiedades térmicas de los polímeros tales como la T_g , la temperatura de cristalización (T_c) y temperatura de fusión (T_m).

EJEMPLO 6: Producción de PHACOS en otras especies.

La producción de PHA con grupos tioéster en la cadena lateral se llevó a cabo en dos fases en M63 0,1N en presencia de 6-ATH 12 mM y ácido decanoico 2,4 mM empleando otras cepas de *Pseudomonas*, como *P. putida* U (0,02 mg/ml de PHACOS), *P. putida* U Δ FadBA (mutante *fadBA*⁻) (0,2 mg/ml de PHACOS) y *P. oleovorans* GPo1 (0,04 mg/ml de PHACOS). Se detecta producción de gránulos de PHA en todos los casos (Tabla 5).

Tabla 5. Composición monomérica en % de los polímeros aislados a partir de las cepas diferentes a *P. putida* KT2442.

	% Monómeros alifáticos	% Monómeros tiol
<i>P. putida</i> U	>95%	trazas
<i>P. putida</i> U FadBA-	83,50%	16,50%
<i>P. oleovorans</i> GPo1	>95%	trazas

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la síntesis de polihidroxicanoatos (PHA) que comprende cultivar una célula capaz de producir PHA en un sustrato, donde dicho sustrato comprende al menos un compuesto alifático funcionalizado con un grupo tioéster.
5
2. El procedimiento según la reivindicación anterior caracterizado porque la célula es una bacteria.
10
3. El procedimiento según la reivindicación anterior caracterizado porque la bacteria pertenece al género *Pseudomonas*.
4. El procedimiento según la reivindicación anterior caracterizado porque la bacteria se selecciona de la lista que comprende: *P. putida* KT2442, *P. putida* U, *P. oleovorans* GPo1, *P. putida* KT42FadB (CECT 7772) y *P. putida* U Δ FadBA.
15
5. El procedimiento según la reivindicación anterior caracterizado porque la bacteria es *P. putida* KT42FadB (CECT 7772).
20
6. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizado porque el compuesto alifático funcionalizado es un ácido acilalcanoico que se selecciona de la lista que comprende los siguientes ácidos: 6-acetiltiohexanoico, 5-acetiltiopentanoico, 2,5-bis(acetilsulfanil)pentanoico, 4-acetiltiolbutanoico, 3-acetilsulfanilbutanoico, 11-acetiltioundecanoico, 16-acetiltiolhexadecanoico, 5-acetiltiooctanoico, 5-propanoyiltiooctanoico, 5-butanoiltiooctanoico, 12-acetiltiododecanoico, 6-acetilsulfanil-8-metilsulfaniloctanoico, 8-acetilsulfanil-6-sulfaniloctanoico, 5-(2-metilpropanoilsulfanil)octanoico, 6,8-bis(acetilsulfanil)octanoico.
25
30

7. El procedimiento según la reivindicación anterior caracterizado porque el compuesto alifático funcionalizado es el ácido 6-acetiltiohexanoico.
8. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores
5 caracterizado porque el sustrato además comprende un compuesto alifático.
9. El procedimiento según la reivindicación anterior caracterizado porque el compuesto alifático es un ácido graso de entre 4 y 28 carbonos.
10. El procedimiento según la reivindicación anterior caracterizado porque el
10 ácido graso se selecciona de la lista que comprende: ácido decanoico, ácido nonanoico y ácido octanoico.
11. El procedimiento según la reivindicación anterior caracterizado porque el
15 compuesto alifático es el ácido decanoico.
12. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores
caracterizado porque el sustrato comprende ácido decanoico y ácido 6-
acetiltiohexanoico.
20
13. El procedimiento según cualquiera de las cinco reivindicaciones anteriores,
caracterizado porque el sustrato comprende una relación molar del
compuesto alifático y compuesto alifático funcionalizado con un grupo
tioéster de entre 1:9 a 9:1.
25
14. El procedimiento según la reivindicación anterior caracterizado porque la
relación es de entre 1,1:8,9 a 2:8.
15. El procedimiento según la reivindicación anterior caracterizado porque la
30 relación es de entre 1,5:8,5 y 1,8:8,2.

- 16.El procedimiento según la reivindicación anterior caracterizado porque el sustrato consiste en ácido decanoico 2,4 mM y ácido 6-acetiltiohexanoico 12 mM.
- 5 17.El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizado porque el cultivo comprende una o dos fases de fermentación.
- 18.El procedimiento según la reivindicación anterior caracterizado porque comprende dos fases de fermentación.
- 10 19.El procedimiento según la reivindicación anterior caracterizado porque la segunda fase de fermentación tiene una duración de entre 5 y 30 horas.
- 15 20.El procedimiento según la reivindicación anterior caracterizado porque la duración es de entre 7 y 26 horas.
- 21.El procedimiento según la reivindicación anterior caracterizado porque la duración es de entre 8 y 25 horas.
- 20 22.Los PHA obtenidos mediante el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
- 23.Cepa bacteriana de la especie *Pseudomonas putida* con número de acceso CECT 7772.
- 25 24.Uso de los PHA según la reivindicación anterior para la producción de materiales bioplásticos, tejidos, biomateriales, sistemas de liberación de fármacos, pegamentos o pinturas.
- 30 25.Uso de los PHA según la reivindicación 22 para la obtención de ácidos (*R*)-3-hidroxi-aciltioalcanoicos enantiopuros.

26. Uso según la reivindicación anterior donde los ácidos (*R*)-3-hidroxi-aciltioalcanoicos enantiopuros se seleccionan de la lista que comprende: ácido 3-hidroxi-6-acetiltiohexanoico, ácido 3-hidroxi-4-acetiltiobutanoico y los derivados hidroxilados de los ácidos 5-acetiltiopentanoico, 2,5-
5 bis(acetilsulfanil)pentanoico, 4-acetiltiolbutanoico, 3-acetilsulfanilbutanoico, 11-acetiltioundecanoico, 16-acetilholhexadecanoico, 5-acetiltiooctanoico, 5-propanoyiltiooctanoico, 5-butanoiltiooctanoico, 12-acetiltiododecanoico, 6-acetilsulfanil-8-metilsulfaniloctanoico, 8-acetilsulfanil-6-sulfaniloctanoico, 5-(2-metilpropanoilsulfanil)octanoico, 6,8-bis(acetilsulfanil)octanoico.
- 10
27. Un procedimiento para la obtención de ácidos (*R*)-3-hidroxi-aciltioalcanoicos enantiopuros que comprende la hidrólisis de los PHA según la reivindicación 22.
- 15
28. El procedimiento según la reivindicación anterior donde la hidrólisis es química.
29. El procedimiento según la reivindicación 27 donde la hidrólisis es enzimática.
- 20
30. El procedimiento según la reivindicación anterior donde la hidrólisis la lleva a cabo una enzima depolimerasa.
31. El procedimiento según la reivindicación anterior donde la enzima depolimerasa es PhaZ.
- 25
32. Los ácidos (*R*)-3-hidroxi-aciltioalcanoicos enantiopuros obtenidos mediante el procedimiento según cualquiera de las cinco reivindicaciones anteriores.

FIG 1

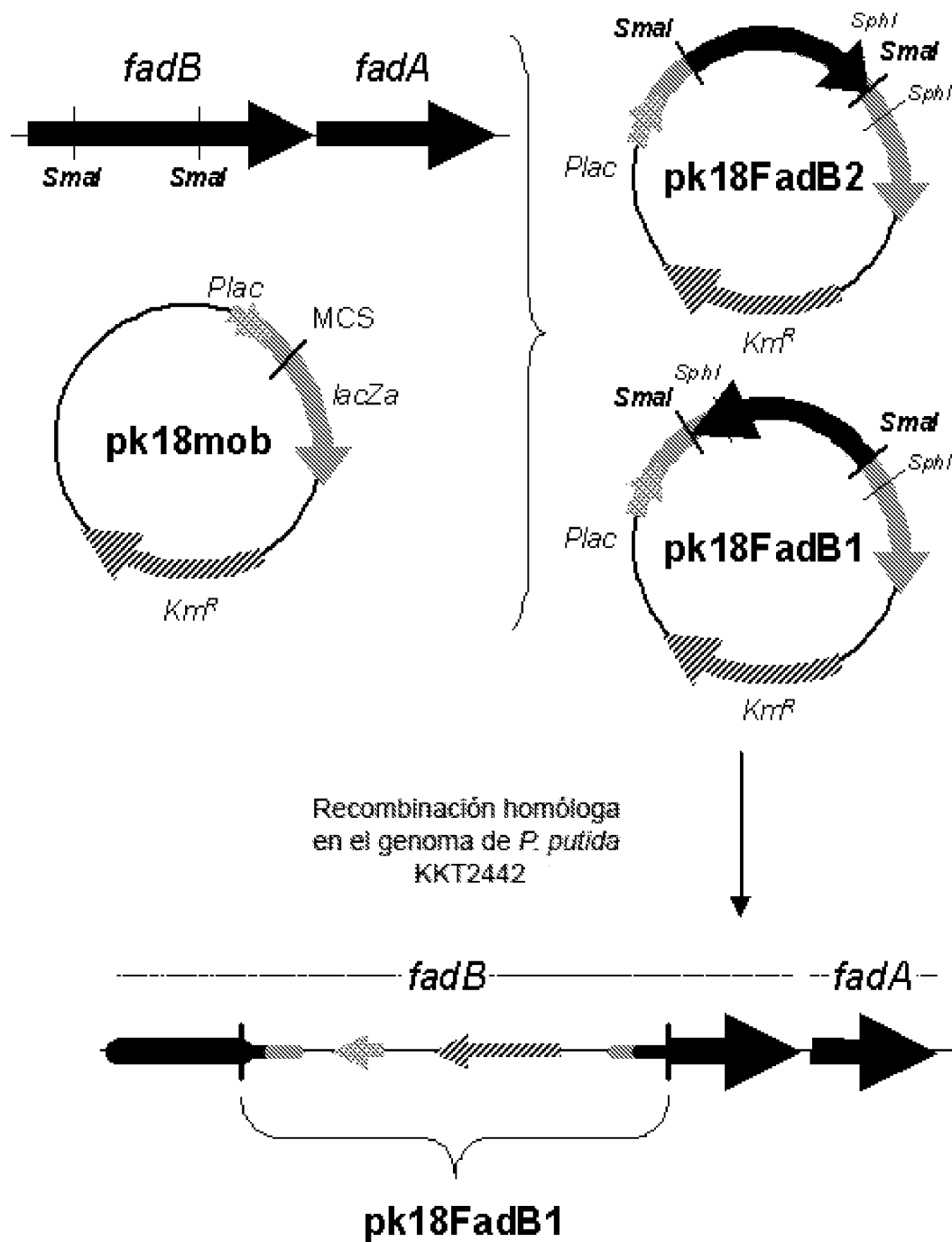


FIG 2

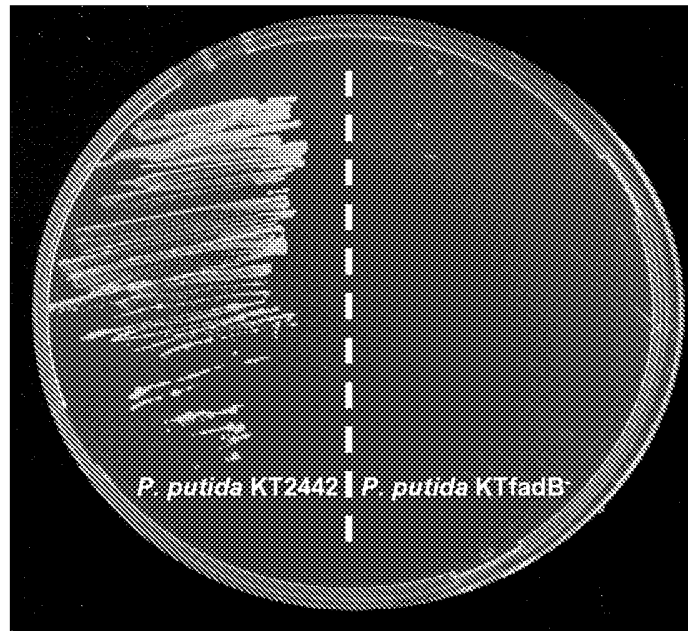


FIG. 3

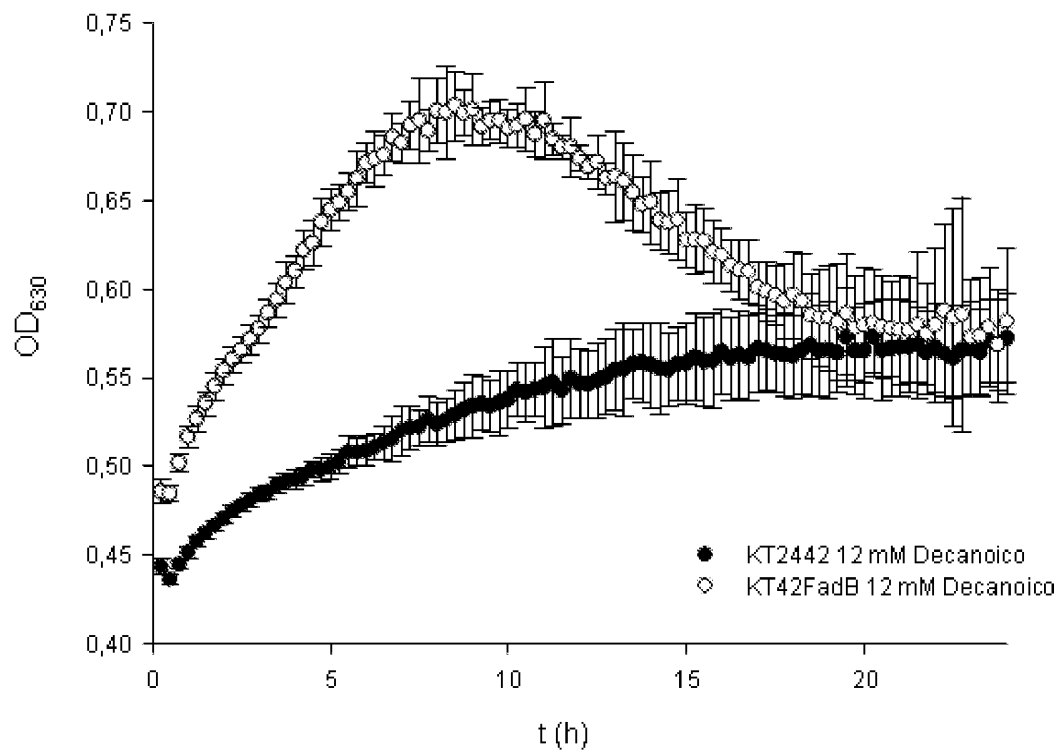


FIG. 4

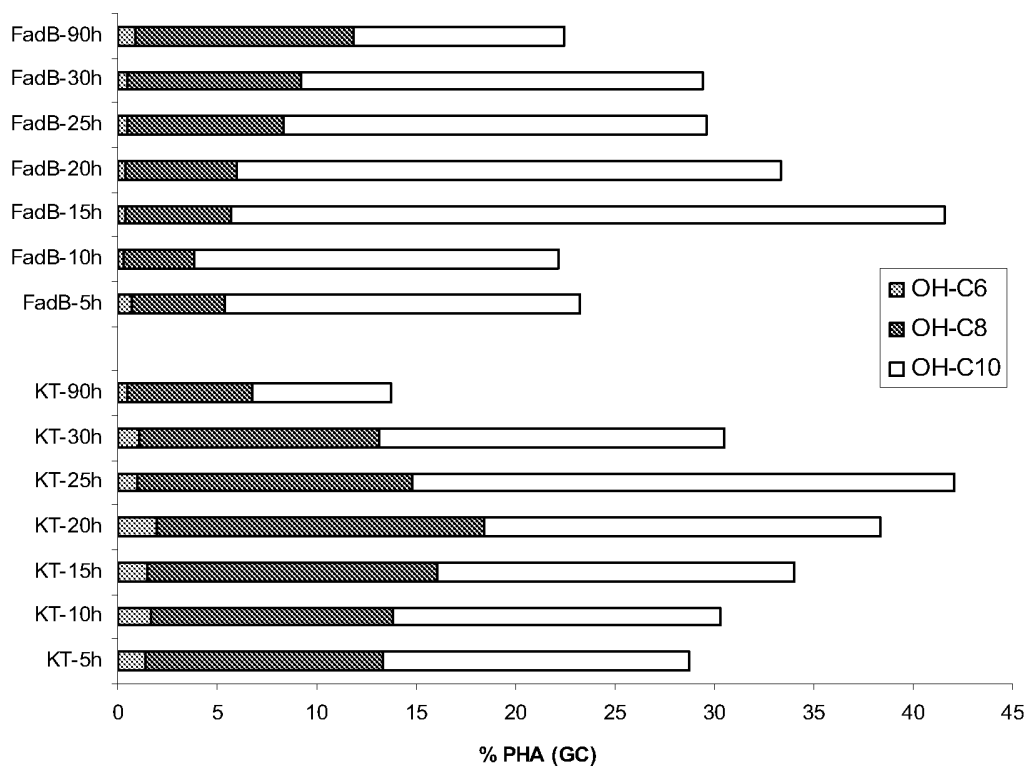


FIG. 5

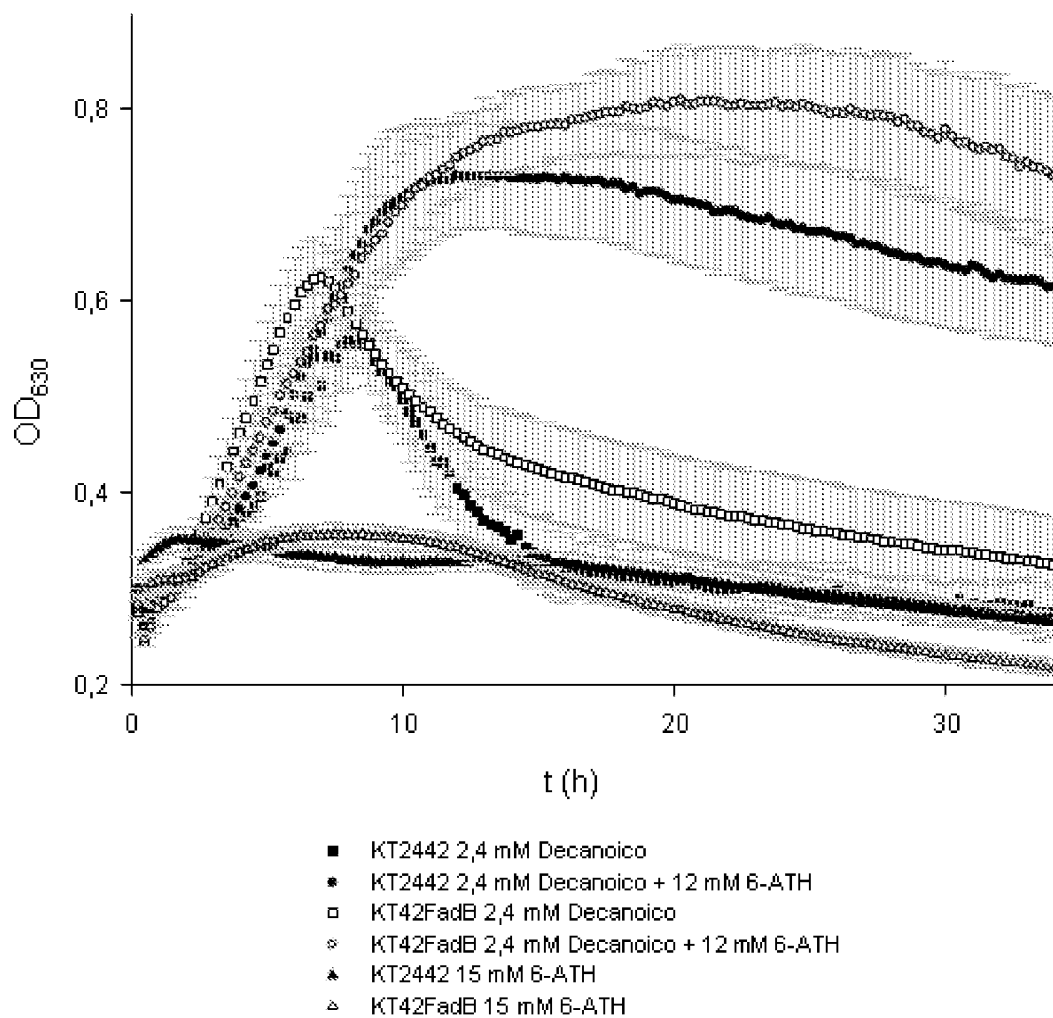


FIG. 6

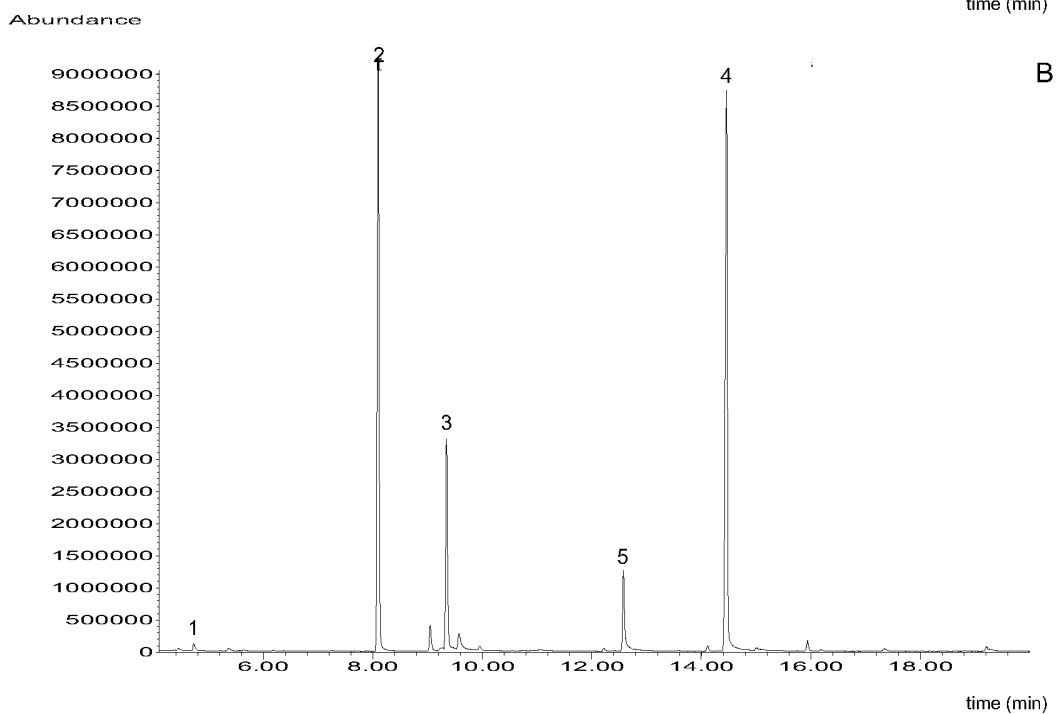
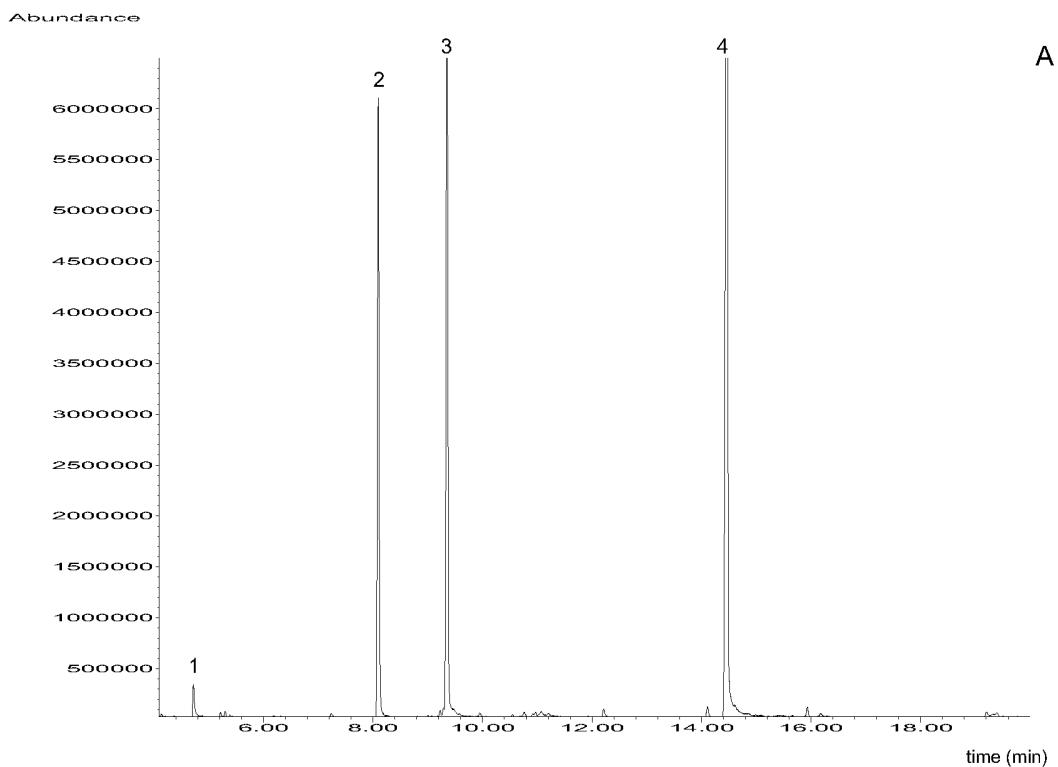


FIG. 7

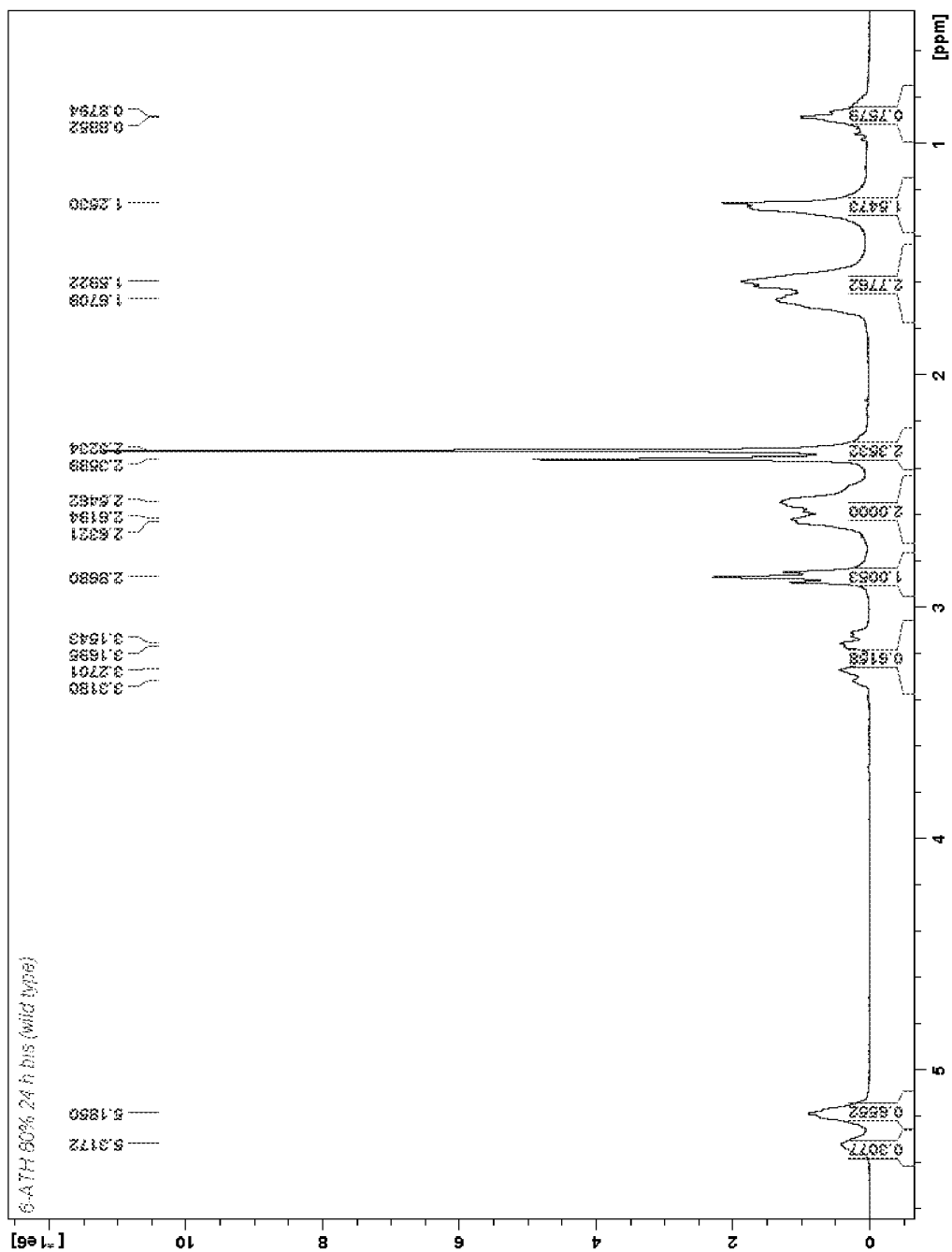


FIG. 8

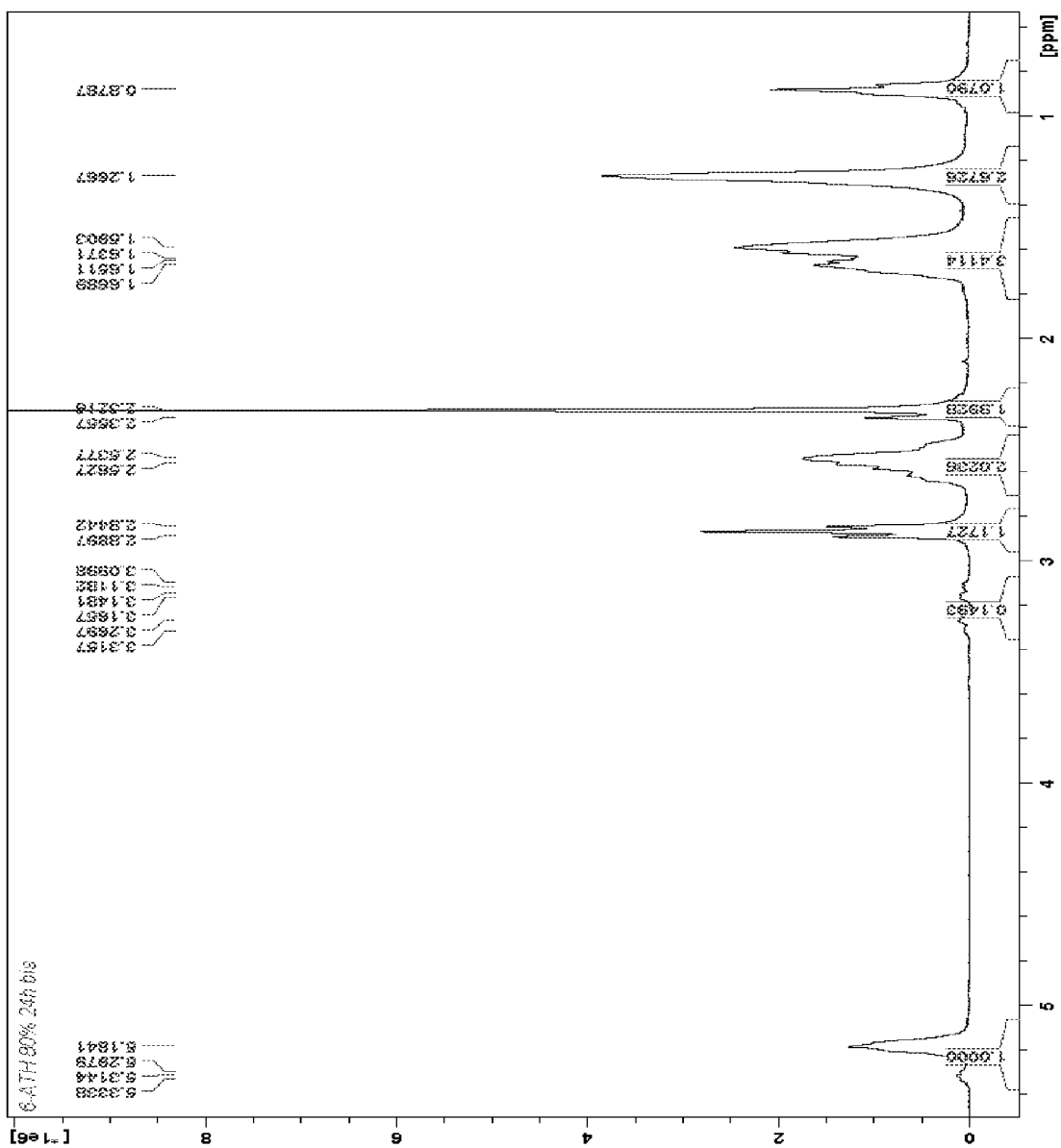


FIG. 9

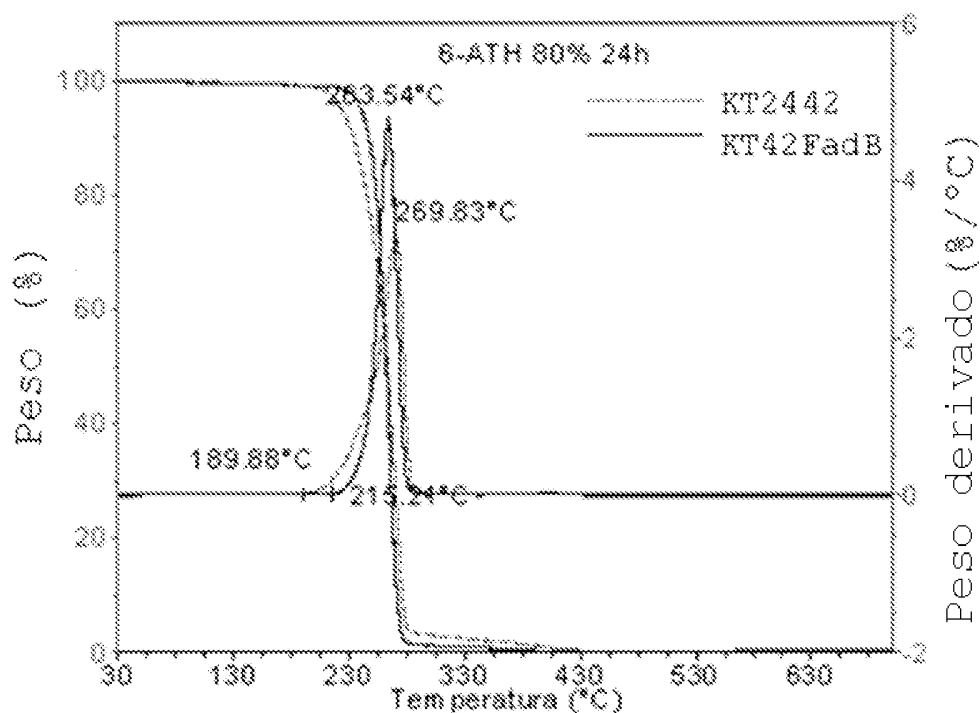
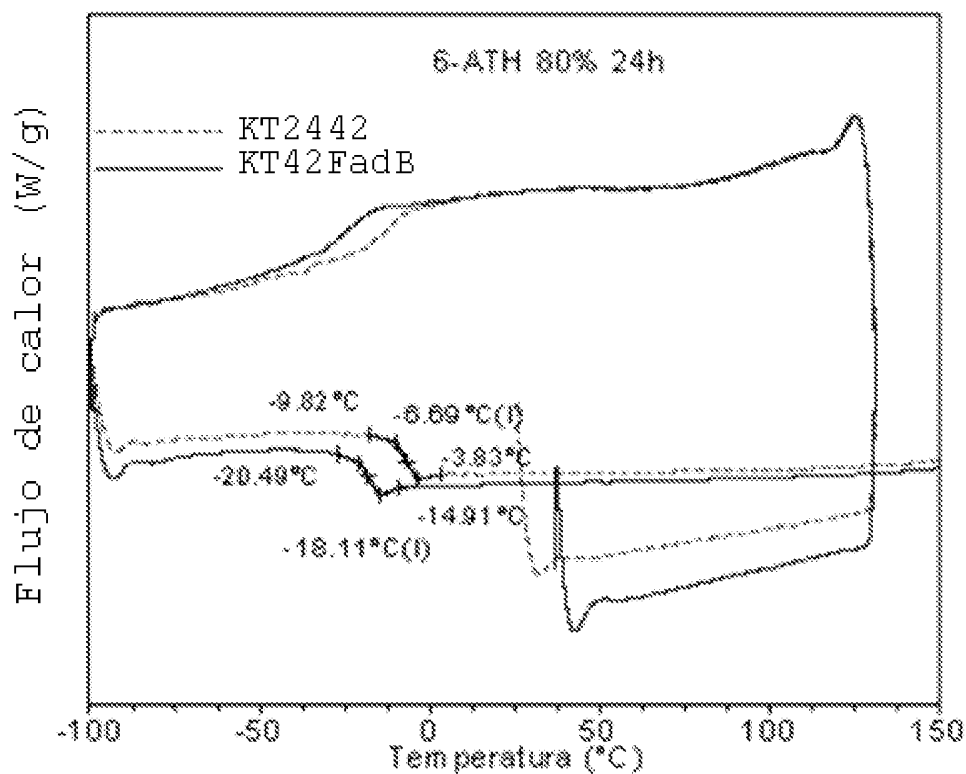


FIG. 10



INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ES2011/070654

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

INV. C12N9/04 C12P7/62 C12P11/00

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

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

C12N C12P

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

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

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
X	WO 02/16627 A2 (TEPHA INC [US]; METABOLIX INC [US]) 28 Febrero 2002 82002-02-28) resumen -----	1-22, 24-32
X	SHA0-PING OUYANG ET AL: "Production of Polyhydroxyalkanoates with High 3-Hydroxydodecanoate Monomer Content by fadB and fadA Knockout Mutant of Pseudomonas putida KT2442", BIOMACROMOLECULES, vol. 8, no. 8, 1 Agosto 2007 (2007-08-01), pages 2504-2511, XP55019220, ISSN: 1525-7797, DOI: 10.1021/bm0702307 resumen ----- -/--	23

<input checked="" type="checkbox"/> En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos	<input checked="" type="checkbox"/> Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo
* Categorías especiales de documentos citados: "A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante. "E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior. "L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada). "O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio. "P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención. "X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado. "Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia. "&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional <p style="text-align: center;">20 Febrero 2012</p>	Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional <p style="text-align: center;">28/02/2012</p>
---	---

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Funcionario autorizado <p style="text-align: center;">van Voorst, Frank</p>
N° de fax	N° de teléfono

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ES2011/070654

C (continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
X,P	<p>ISABEL F ESCAPA ET AL: "Disruption of Î-oxidation pathway inKT2442 to produce new functionalized PHAs with thioester groups", APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 89, no. 5, 26 January 2011 (2011-01-26), pages 1583-1598, XP019880838, ISSN: 1432-0614, DOI: 10.1007/S00253-011-3099-4</p> <p style="text-align: center;">Todo el documento -----</p>	1-32

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional N°

PCT/ES2011/070654

WO 0216627	A2	28-02-2002	AU	8504101 A	04-03-2002
			WO	0216627 A2	28-02-2002

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/ES2011/070654

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12N9/04 C12P7/62 C12P11/00 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N C12P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EP0-Internal		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 02/16627 A2 (TEPHA INC [US]; METABOLIX INC [US]) 28 February 2002 (2002-02-28) abstract -----	1-22, 24-32
X	SHAO-PING OUYANG ET AL: "Production of Polyhydroxyalkanoates with High 3-Hydroxydodecanoate Monomer Content by fadB and fadA Knockout Mutant of Pseudomonas putida KT2442", BIOMACROMOLECULES, vol. 8, no. 8, 1 August 2007 (2007-08-01), pages 2504-2511, XP55019220, ISSN: 1525-7797, DOI: 10.1021/bm0702307 abstract ----- -/--	23
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search 20 February 2012		Date of mailing of the international search report 28/02/2012
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer van Voorst, Frank

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/ES2011/070654

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	<p>ISABEL F ESCAPA ET AL: "Disruption of Î-oxidation pathway inKT2442 to produce new functionalized PHAs with thioester groups", APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 89, no. 5, 26 January 2011 (2011-01-26), pages 1583-1598, XP019880838, ISSN: 1432-0614, DOI: 10.1007/S00253-011-3099-4 the whole document</p> <p align="center">-----</p>	1-32

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/ES2011/070654

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0216627	A2	AU 8504101 A	04-03-2002
		WO 0216627 A2	28-02-2002
