



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 205 202**

⑤① Int. Cl.7: **C12N 1/12**
C12N 1/14
C12P 7/64
C12N 1/00

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧⑥ Número de solicitud: **97916373 .0**
⑧⑥ Fecha de presentación: **21.03.1997**
⑧⑦ Número de presentación de la solicitud: **0906414**
⑧⑦ Fecha de publicación de la solicitud: **07.04.1999**

⑤④ Título: **Procedimiento para la preparación de una biomasa microbiana granular y aislamiento de compuestos valiosos contenidos en ella.**

③⑩ Prioridad: **28.03.1996 EP 96200837**

④⑤ Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.05.2004

④⑤ Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.05.2004

⑦③ Titular/es: **DSM IP Assets B.V.**
Het Overloon, 1
6411 TE Heerlen, NL

⑦② Inventor/es: **Bijl, Hendrik, Louis;**
Schaap, Albert y
Visser, Johannes, Martinus, Jacobus

⑦④ Agente: **Tavira Montes-Jovellar, Antonio**

ES 2 205 202 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la preparación de una biomasa microbiana granular y aislamiento de compuestos valiosos contenidos en ella.

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento para tratar biomasa microbiana (generalmente un producto que contiene microorganismos resultante de la fermentación) que puede permitir el aislamiento de un compuesto o compuestos útiles o valiosos de la biomasa resultante que ha de mejorarse. El procedimiento puede implicar granular la biomasa (por ejemplo mediante extrusión) antes de la recuperación del compuesto o los compuestos.

Antecedentes de la invención

Durante algún tiempo se han conocido nuevos microorganismos como fuentes valiosas para una gama variada de productos. Varios de estos productos microbianos están situados dentro de, o están asociados con, la célula microbiana. Para recuperar tales productos en una forma relativamente pura, es necesario separar el producto de la biomasa microbiana. Por ejemplo, para aislar compuestos lipófilos de biomasa microbiana, habitualmente se realiza una etapa de extracción (lixiviación) con un disolvente orgánico o un fluido supercrítico (por ejemplo, CO₂ líquido).

La biomasa resulta de la fermentación y puede usarse para la extracción de productos. Habitualmente es una torta celular mojada pero diversos pretratamientos provocan una ruptura significativa de las células. La ruptura de las células puede producirse mediante tratamiento físico (por ejemplo, secado, tal como secado por pulverización o liofilización) y/o desintegración mecánica (tal como mediante homogeneización o molienda), mediante tratamiento químico (ácido o álcali) o enzimático. El secado de la biomasa es deseable para reducir la cantidad de disolventes y, en el caso de la extracción de compuestos lipófilos, para evitar emulsiones engorrosas.

Habitualmente, se usa el secado por pulverización para obtener biomasa que a continuación está lista para la extracción. El secado mediante secadores de pulverización requiere las siguientes condiciones: para alimentar el secador, la biomasa debe ser un líquido (concentrado) o una suspensión con partículas pequeñas (para permitir la pulverización mediante un disco o una tobera). Esto significa que para una biomasa microbiana el contenido de materia seca máximo de la suspensión está limitado a aproximadamente 20-30%, dando como resultado una etapa de secado posterior, para alcanzar un contenido de materia seca de 90-95%, lo que será relativamente costoso.

El procedimiento de secado por pulverización es relativamente corto en términos de tiempo. Sin embargo, la temperatura del producto en la mayoría de los casos es (relativamente) alta. Esto significa que existe un alto riesgo de oxidación y degradación posterior para compuestos sensibles a la oxidación. En el caso de una biomasa con cantidades altas de material lipídico intracelular, el secado es a veces engorroso debido a la "exudación" del lípido desde la biomasa a temperaturas superiores. En este caso, se producirá el ensuciamiento del secador.

Otro inconveniente del secado por pulverización es que este limita significativamente el tipo de procedimiento de extracción que puede usarse posteriormente para aislar un compuesto deseado. Habitualmente, es imposible aplicar, por ejemplo, técnicas de extracción por percolación sobre productos de polvo fino tales como biomasa secada por pulverización. La ruptura mecánica de la biomasa microbiana, tal como mediante molienda, también tiene el mismo inconveniente de producir un gran cantidad de finos (o polvo fino).

La Patente del Reino Unido N° GB 1 566 853 se refiere a un procedimiento para aislar aceite de polvo de levadura secado por pulverización. El polvo de levadura se moja y se calienta mediante vapor de agua a 180°C en un horno. El polvo mojado se alimentó a continuación a una máquina de formación de pelets, se convirtió en pelets, se convirtió en escamas y se secó de nuevo para reducir el contenido de humedad hasta 5-10% en peso. Las escamas resultantes se filtraron a continuación mediante un tamiz y a continuación se reciclaron al formador de pelets. Este material era adecuado para extracción por percolación. Sin embargo, el método tiene la desventaja de que el polvo, una vez que se ha secado por pulverización, necesita rehidratarse, tratarse a altas temperaturas y a continuación secarse de nuevo. Para compuestos termosensibles y/o sensibles a la oxidación, tales etapas de tratamiento adversas dan como resultado la degradación y de ahí rendimientos escasos.

La solicitud de Patente Internacional WO-A-93/25644 (equivalente al documento US 5.539.133) se refiere a un método para el aislamiento de lípidos con un alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) a partir de macro- y/o micro-algas (un tipo de planta marina), donde a veces las macroalgas pueden ser residuos de extracción con alginato o carragenano. El material derivado de algas tiene tamaños de las partículas de menos de 50 mm y un contenido de materia seca de más de 50%. Con material de algas que tiene un tamaño de las partículas mayor y/o un contenido de materia seca menor que los valores indicados, el material necesita pretratarse mediante molienda y/o secado. Sin embargo, como se indica previamente, la molienda es poco ventajosa para un procedimiento de extracción y refinado eficaz.

El documento DD-A-150627 se refiere a preparar una biomasa que contiene levaduras (o bacterias), que se seca y a continuación se elabora como gránulos grandes (8-12 mm, aparentemente esféricos). Estos tienen un contenido de agua de 20% y a continuación se muelen. La extracción se realiza usando éter de petróleo para regenerar gasoil (o

ES 2 205 202 T3

hidrocarburos) no deseado que se usó como una fuente de carbono para los microorganismos. El residuo restante se usa como un pienso para animales.

5 El documento DE-A-1923529 se refiere a una biomasa que se somete a evaporación antes de secarse sobre un lecho fluido para producir gránulos. Estos se muelen o se desmenuzan a continuación. El aceite residual (como un contaminante) se extrae a continuación. En común con el documento previo, la sustancia que se extrae es una impureza y no es producida por los microorganismos contenidos en la biomasa.

10 El documento EP-A-0322227 se refiere a un procedimiento para la producción de ácido araquidónico (ARA) y ácido gamma-linoleico (GLA) al alimentar a un microorganismo con aceite de sésamo.

La Patente de EE.UU. N° 5.340.594 se refiere a la producción de ácidos grasos altamente insaturados a partir de hongos. La biomasa puede mezclarse con maíz triturado y el producto resultante usarse como un pienso para animales.

15 El documento WO-A-92/12711 se refiere a combinaciones de aceites microbianos, particularmente como complementos para fórmulas infantiles, donde la biomasa se filtra y se escurre sobre un filtro para producir una torta filtrante, que a continuación se seca por congelación.

20 La presente invención busca proporcionar un procedimiento de extracción de compuestos deseados a partir de una biomasa, que pueda solucionar algunos o todos los problemas presentes en la técnica anterior.

Descripción de la invención

25 De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento para el aislamiento de uno o más compuestos a partir de una biomasa microbiana que comprende un microorganismo que ha producido uno del compuesto o los compuestos, comprendiendo el procedimiento:

- a) proporcionar, u obtener, una biomasa con un contenido de materia seca de 25% a 80%;
- 30 b) granular la biomasa en partículas granulares que tienen un contenido de materia seca medio de 25% a 80%;
- c) secar las partículas granulares para producir gránulos secados que tienen un contenido de materia seca medio de al menos 80%; y
- 35 d) purificar, extraer o aislar el o cada compuesto de los gránulos secados resultantes de (c).

Se ha encontrado sorprendentemente que al usar gránulos secados de la biomasa puede alcanzarse un rendimiento superior al esperado del compuesto que ha de aislarse. Se cree que esto se debe a la estructura de los gránulos que puede maximizar el acceso del disolvente que ha de usarse para la extracción. Por supuesto, si las partículas son demasiado grandes, entonces la superficie específica puede ser inferior, dando como resultado un rendimiento correspondientemente inferior. Sin embargo, las partículas no deben ser demasiado pequeñas pues pueden obturar el filtro que se usa durante la extracción. Por esta razón, el procedimiento de la invención no incluye una etapa o fase de molienda, formación de escamas o porfirización.

45 El contenido de agua en diversas fases también puede influir en los rendimientos. Un contenido de materia seca demasiado alto y la biomasa se desmenuzará y puede formar finos o polvo fino, lo que es poco ventajoso si se emplea un método de extracción por filtración. Sin embargo, un contenido de agua demasiado alto y se obtiene una suspensión que está demasiado mojada para formarse como gránulos.

50 Procedimientos para granular materia son conocidos en la técnica. Sin embargo, a menudo se combinan con molienda o formación de escamas en alguna fase, lo que da las desventajas que se analizan anteriormente. En la presente invención, son los gránulos secados los que se usan para la extracción del compuesto, y no una forma molida o en escamas. Además, mediante granulación, puede minimizarse el daño a las células en la biomasa, lo que de nuevo puede ayudar a incrementar los rendimientos del compuesto. En el documento US 5.340.594, se describe la extrusión de una biomasa, pero aquí la forma extruida se usa como un pienso para animales: no se apreció que la forma granular diera altos rendimientos durante la extracción de un compuesto particular a partir de esa forma granular.

60 Al procesar la biomasa como partículas granulares, se puede ayudar al procedimiento de secado. El secado puede ser considerablemente más fácil y más eficaz después de que la biomasa se haya procesado en una forma granular.

65 Además, se ha encontrado que los gránulos secados son particularmente estables, especialmente a temperaturas ambiente o normales. La biomasa puede almacenarse durante un espacio de tiempo considerable en esta forma, sin degradación. Aunque sin querer limitarse por una teoría, se sospecha que esto se produce debido a que el compuesto está situado dentro de los gránulos y por lo tanto al menos parcialmente protegido con el entorno, lo que puede, para ciertos compuestos, provocar degradación mediante oxidación.

De acuerdo con un segundo aspecto de la invención, se proporciona una composición que comprende partículas granulares de biomasa, teniendo las partículas un contenido de materia seca medio de al menos 30%, pero menor que

ES 2 205 202 T3

70%, y habiéndose obtenido al granular la biomasa. Tales partículas granulares pueden obtenerse al usar el procedimiento del primer aspecto, y resultan de la fase de granulación (b).

De acuerdo con un tercer aspecto de la invención, se proporciona una composición que comprende gránulos secados, derivándose los gránulos de una biomasa microbiana y teniendo un contenido de materia seca (medio) de al menos 80%. Estos gránulos pueden obtenerse al usar el procedimiento del primer aspecto y resultan después de la fase de secado (c). Se ha encontrado que tales composiciones son una forma particularmente estable de biomasa. Puede almacenarse durante semanas, si no años (por ejemplo, a temperatura normal), con poca o ninguna degradación o cambios en sus propiedades. Esto significa que el compuesto o los compuestos que contiene también pueden almacenarse establemente (o incluso transportarse). Por otra parte, puede almacenarse a temperatura normal, lo que evita la necesidad de congelar o almacenar a temperaturas particularmente bajas, que es el caso para materiales de biomasa de la técnica anterior. Claramente, tal estabilidad es ventajosa ya que las condiciones de almacenamiento son considerablemente más económicas.

El método preferido para granular la biomasa es mediante extrusión. Esto puede minimizar la destrucción de las células. Se ha encontrado que la estabilidad de la biomasa es mejor con una ruptura mínima de las células, en otras palabras, el procedimiento de la invención puede adaptarse para optimizar el número de células que permanecen intactas. Esto está en contraste con muchas extracciones de la técnica anterior, donde las células se rompen para aislar el compuesto.

Un cuarto aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento para el aislamiento de uno o más compuestos de gránulos de biomasa, comprendiendo el procedimiento:

- a) proporcionar gránulos secados que tienen un contenido de materia seca de al menos 80%, habiéndose derivado los gránulos de una biomasa microbiana que comprende microorganismos que han producido tal compuesto; y
- b) extraer o aislar el o cada compuesto de los gránulos secados mediante extracción con disolvente.

El método de extracción preferido se emplea en un disolvente, en el que adecuadamente el compuesto es soluble. El método de extracción preferido es usar percolación: aquí el disolvente puede hacerse pasar sobre un lecho de los gránulos. Para esta técnica, se apreciará que las partículas no deben ser demasiado pequeñas (por ejemplo, no deben molerse o porfirizarse) o de otro modo se obtendrá demasiado "polvo fino" (o finos) que puede obturar el filtro. También han de evitarse partículas grandes, pero entre estos dos extremos se puede obtener una superficie específica óptima, de modo que preferiblemente los gránulos son mayores que los poros del filtro. Las partículas son preferiblemente altamente porosas para permitir un acceso fácil del disolvente al compuesto que ha de extraerse.

En la presente invención, el pretratamiento de la torta de la biomasa microbiana para formar partículas granulares puede mejorar significativamente el procedimiento de secado posterior. La biomasa granulada secada resultante puede ser particularmente adecuada para extracción por inmersión o percolación. El tamaño de las partículas puede ajustarse específicamente para condiciones de secado y extracción óptimas. Al usar una biomasa pretratada de acuerdo con la invención, el compuesto deseado se extrae ventajosamente sin la necesidad de romper las células antes de la extracción.

El procedimiento de la invención puede usarse para preparar partículas granulares o gránulos secados a partir de casi cualquier tipo de microorganismo. El microorganismo puede estar en una forma filamentososa, como hongos o ciertas bacterias, o como células simples, como levaduras, algas y bacterias. Así, la biomasa puede comprender microorganismos que son levaduras, hongos, bacterias o algas. Hongos preferidos son del orden *Mucorales*. Por ejemplo, el hongo puede ser del género *Mortierella*, *Phycomyces*, *Blakeslea* o *Aspergillus*. Hongos preferidos son de las especies *Mortierella alpina*, *Blakeslea trispora* y *Aspergillus terreus*.

En lo que se refiere a las levaduras, son preferiblemente del género *Pichia*, tal como de la especie *Pichia ciferrii*.

Las bacterias pueden ser del género *Propionibacterium*.

Si la biomasa comprende un alga, esta es preferiblemente un dinoflagelado y/o pertenece al género *Cryptocodinium*. Algas preferidas son de la especie *Cryptocodinium cohnii*.

El compuesto que ha de aislarse de la biomasa microbiana preparada de acuerdo con la invención puede estar situado intracelularmente, asociado con la membrana celular o la pared celular, o producirse extracelularmente (entonces puede ser insoluble en agua).

El compuesto que ha de aislarse puede ser hidrófilo o hidrófobo (por ejemplo, lipófilo). Ejemplos de tales compuestos son proteínas o enzimas intracelulares, lípidos, metabolitos secundarios como vitaminas (por ejemplo vitamina B₁₂), antibióticos macrólidos o poliénicos, sustancias que proporcionan sabor o carotenoides. Preferiblemente, el compuesto que ha de aislarse de tal biomasa microbiana es un compuesto lipófilo.

El compuesto extraído de la biomasa tratada de acuerdo con la invención puede ser de alta calidad ya que se ha sometido a poco deterioro, si es que existe, debido a las condiciones suaves usadas en el procedimiento de tratamiento.

ES 2 205 202 T3

Por lo tanto, la invención es particularmente adecuada para la preparación de biomasa microbiana a partir de la cual necesitan aislarse un compuesto o compuestos termosensibles y/o sensibles a la oxidación.

5 La invención es adecuada para preparar biomasa microbiana a partir del aislamiento de compuestos que tienen un alto grado de insaturación, tales como lípidos que contienen ácidos grasos poliinsaturados (PUFA). Preferiblemente, el PUFA es un ácido graso poliinsaturado ω -3 u ω -6 C18, C20 o C22. Por ejemplo, el compuesto puede ser ácido docosahexaenoico (DHA) (procedente de algas u hongos, tales como el dinoflagelado *Cryptothecodinium* o el hongo *Thraustochytrium*), ácido γ -linolénico (GLA), ácido dihomo- γ -linolénico o araquidónico (ARA) (procedente de hongos, tales como *Mortierella*, *Pythium* o *Entomophthora*), o ácido eicosapentaenoico (EPA) (procedente de algas, tales como *Porphyridium* o *Nitzschia*). Cualquiera de estos PUFAs puede aislarse por sí mismo o, más habitualmente, en la forma de un lípido.

15 Ejemplos adicionales de compuestos que pueden aislarse de acuerdo con la invención incluyen β -caroteno, tal como procedente de géneros fúngicos, por ejemplo del orden Mucorales, por ejemplo *Phycomyces* o *Blakeslea*, astaxantina de la levadura *Phaffia rhodozyma*, tetraacetilfitesingosina (TAPS) de la levadura *Pichia ciferrii*, y/o vitamina B12 de bacterias propiónicas.

20 Otros compuestos que pueden extraerse incluyen los lipófilos/no polares tales como lovastatina, ciclosporina y laidlomocina. De estos, los dos primeros se producen extracelularmente o unidos a la pared celular. Disolventes adecuados, por lo tanto, incluyen heptano, hexano, acetona, metanol y tolueno, y etanol. Sin embargo, para los dos últimos compuestos, puede usarse alcohol isopropílico o acetato de butilo para la ciclosporina, y etanol o metanol para la laidlomocina. En general, el hexano es adecuado para antibióticos apolares, tales como los producidos por los organismos del género *Streptomyces*.

25 Otros compuestos incluyen policétidos, o metabolitos derivados de policétidos, que incluyen muchos antibióticos. Policétidos preferidos son los que no contienen nitrógeno, y pueden ser aromáticos, conteniendo preferiblemente al menos un anillo de 6 miembros. Policétidos preferidos son estatinas, que incluyen lovastatina, simvastatina, pravastatina y compactina. Otros compuestos preferidos son inhibidores de HMG-CoA reductasa. Estos pueden reducir los niveles de colesterol en sangre.

30 Otra clase de compuestos que puede extraerse incluye esteroides, tales como ergosterol. Estos son producidos por levaduras y mohos.

35 El procedimiento de la invención es particularmente adecuado para el aislamiento de compuestos lipófilos, tales como lípidos y/o carotenoides que contienen ácidos grasos poliinsaturados (PUFA).

40 Los compuestos aislados de acuerdo con las composiciones del procedimiento o los procedimientos de la invención son adecuados para uso en alimentos para seres humanos o animales (por ejemplo, fórmulas infantiles) u otras composiciones comestibles, y en cosméticos, composiciones o complementos para el cuidado de la salud o composiciones farmacéuticas.

45 En el procedimiento de la invención el microorganismo de elección puede fermentarse en primer lugar para obtener una cantidad suficiente de biomasa para la extracción posterior del compuesto. Las condiciones de fermentación dependerán del organismo usado y pueden optimizarse para un alto contenido del compuesto en la biomasa resultante.

Condiciones de fermentación adecuadas se presentan en el Ejemplo Comparativo 26.

50 Después de que el procedimiento de fermentación haya acabado, el caldo de fermentación, dependiendo del tipo de compuesto que ha de aislarse, puede pasteurizarse para destruir el organismo de producción y para inactivar cualesquiera enzimas no deseables. Si se desea, pueden añadirse agentes de floculación y/u otros adyuvantes del procesamiento al caldo para mejorar su capacidad de filtración.

55 Agentes floculantes adecuados incluyen CaCl_2 , $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ y poliamidas catiónicas polares. Estas pueden estar presentes en de 0,1 a 2% en peso.

60 Preferiblemente, la biomasa (o el caldo) se pasteuriza. Después de la fermentación, la pasteurización puede ser necesaria para obtener una suspensión que pueda procesarse de un modo higiénico. La pasteurización de la biomasa en el fermentador puede tener varias ventajas. En primer lugar, el organismo de producción no se expone al ambiente. Además, pueden inactivarse actividades enzimáticas no deseadas, que influyen en la calidad del compuesto elegido como objetivo.

65 Dependiendo de la especie del organismo de producción, la pasteurización se realiza a temperaturas de 60 a 100°C. La pasteurización puede realizarse al calentar (directamente) con vapor de agua en el fermentador o mediante calentamiento (indirecto) usando un medio a través de cambiadores de calor, a través de la pared o con serpentines de enfriamiento o un cambiador de calor externo tal como los cambiadores de calor de platos conocidos u otros cambiadores de calor adecuados.

ES 2 205 202 T3

Las siguientes condiciones de pasteurización preferidas pueden emplearse, especialmente para organismos del género *Mortierella*.

5 El caldo de fermentación (o biomasa) se pasteuriza para destruir el microorganismo y para inactivar la actividad enzimática. Esto puede ser aproximadamente 144 horas después de la inoculación del fermentador principal. La biomasa (o el caldo) se pasteuriza adecuadamente a de 50 a 95°C, preferiblemente de 60 a 75°C, y óptimamente entre 63 y 68°C. Esto puede ser durante de 30 a 90 minutos, preferiblemente de 50 a 75 minutos, óptimamente de 55 a 65 minutos. Esto puede ser mediante cualquier medio de calentamiento adecuado, pero es preferiblemente mediante inyección directa de vapor de agua, tal como en el recipiente de fermentación principal.

10 Después de la pasteurización, el caldo se deja enfriar, o se enfría. Esto puede llevar aproximadamente 4 horas, adecuadamente hasta aproximadamente 25°C.

15 Si están implicados dos o más organismos, procedentes de diferentes biomásas o caldos de fermentación, entonces cada biomasa (o caldo) puede pasteurizarse individualmente o, después de la mezcladura, pueden pasteurizarse a continuación. Sin embargo, lo primero se prefiere ya que pueden emplearse diferentes condiciones de pasteurización para los diferentes organismos.

20 Habitualmente, la pasteurización tendrá lugar en el recipiente del fermentador en el que se ha producido la fermentación. Sin embargo, para algunos organismos (tales como bacterias), a menudo se prefiere retirar los microorganismos del recipiente en primer lugar y a continuación pasteurizar (por ejemplo, antes de secar por pulverización en un procedimiento de granulación por aglomeración).

25 En general, la pasteurización es ventajosa debido a que no sólo puede destruir el microorganismo, sino que, de forma más importante, puede inactivar una o más enzimas que pueden afectar adversamente al compuesto. Por ejemplo, la pasteurización puede inactivar diversas lipasas, y estas pueden separar ácidos grasos de una cadena principal de triglicérido. Esto es poco ventajoso para PUFAs en los que se prefiere un alto contenido de triglicérido.

30 Como se habrá apreciado, la pasteurización habitualmente destruirá la mayoría de, si no todos, los microorganismos. Por lo tanto, en los gránulos secados, al menos 95%, tal como al menos 98%, si no 99%, de los microorganismos han sido destruidos (es decir, no están vivos).

Para algunos organismos (por ejemplo *Pichia*) preferiblemente no se efectúa la pasteurización.

35 Para evitar la recontaminación de la biomasa pasteurizada durante las etapas de procesamiento posteriores, pueden diseñarse condiciones para reducir el riesgo de crecimiento. Una posibilidad es acidificar el caldo con un ácido adecuado. Para evitar el sobrecrecimiento de muchas especies microbianas, es suficiente un intervalo de pH de 3 a 4 en combinación con una temperatura de procesamiento baja.

40 Además, otros agentes bioestáticos, como alcoholes, sorbatos, etc., pueden usarse para este propósito.

Para productos térmicamente estables puede aplicarse el procesamiento a temperaturas superiores (60-100°C).

45 Condiciones de acidificación preferidas (por ejemplo, para organismos del género *Mortierella*) son como siguen.

El pH del caldo pasteurizado se ajusta hasta de 2 a 5 para mejorar la estabilidad microbiológica, preferiblemente hasta un pH en el intervalo de 3 a 4, y óptimamente un pH de aproximadamente 3,5.

50 La acidificación del caldo (antes o después de la pasteurización) puede tener ventajas adicionales. Si el compuesto es un policétido, por ejemplo una estatina, entonces la acidificación puede dar como resultado la precipitación del compuesto. Para muchos compuestos, especialmente los solubles en agua, es deseable la precipitación antes de etapas de procesamiento adicionales, para que el compuesto no se pierda cuando el caldo se filtra para retirar agua. Por lo tanto, antes o después de la pasteurización, puede precipitarse un compuesto (tal como mediante acidificación, aunque puede emplearse cualquier otro medio conocido por un experto en la técnica).

55 El pH puede ajustarse mediante cualquier medio adecuado, por ejemplo ácido fosfórico al 85%, preferiblemente ácido fosfórico al 55% diluido y opcionalmente con ácido fosfórico al 33% diluido.

60 En esta fase se tiene un caldo que puede haberse pasteurizado. La siguiente fase es obtener una biomasa, al separar los microorganismos del medio circundante.

65 Puede realizarse una técnica de separación sólido-líquido para separar la biomasa del caldo de fermentación. Esta biomasa (recogida) habitualmente tiene un contenido de materia seca que varía de 20 a 35%, dependiendo del tipo de microorganismo. Sin embargo, para la extrusión (y el secado posterior) la biomasa debe tener típicamente un contenido de materia seca que varía de 25% a 80%.

Si el contenido de agua de la biomasa es demasiado alto (por ejemplo, para la extrusión y/o el secado posterior), puede deshidratarse y/o tener su contenido de materia seca incrementado. Esto puede alcanzarse mediante un número

ES 2 205 202 T3

de métodos. En primer lugar, la biomasa puede someterse a deshidratación (adicional). Puede usarse cualquier método de deshidratación conocido por los expertos; el contenido de materia seca deseado puede ser de 25 ó 30 a 80%.

Preferiblemente, se usa un método de deshidratación mecánico. El contenido de materia seca máximo que puede alcanzarse mediante deshidratación mecánica, sin embargo, dependerá del tipo de microorganismos. Para ciertos microorganismos, por ejemplo levadura, el contenido de materia seca de la biomasa después de la deshidratación mecánica no puede superar un nivel de 35 a 40%, mientras que el mismo procedimiento ejecutado sobre una biomasa de ciertos microorganismos ricos en lípidos puede dar como resultado un contenido de materia seca superior de 45 a 60%.

Un método preferido es usar una prensa filtrante de membrana (prensa filtrante de platos y marcos con membranas escurridoras) que puede combinar una separación sólido-líquido con deshidratación mecánica y es especialmente adecuada para obtener el contenido de materia seca deseado.

Alternativamente o además, el contenido de materia seca deseado de la biomasa microbiana puede incrementarse mediante la adición de agentes que incrementan la consistencia (o secos). Estos agentes que incrementan la consistencia están adecuadamente secos y, preferiblemente, no interfieren negativamente con el procedimiento de extracción y/o las propiedades del compuesto. Por ejemplo, agentes que incrementan la consistencia pueden comprender almidón y/o fibras de plantas tales como salvado de avena o trigo, o celulosa. Incluso puede usarse otra biomasa (de un contenido de agua inferior). Tales sustancias pueden añadirse de cualquier modo, siempre que mejore la capacidad de extrusión.

A veces, por ejemplo después de la separación sólido-líquido y/o la deshidratación mecánica, la biomasa puede formar tortas grandes. Esto puede no ser adecuado para la granulación (por ejemplo extrusión). Para reducir la biomasa hasta un tamaño que pueda permitir la granulación (por ejemplo, alimentación eficaz de la extrusora), la biomasa se tritura, se amasa y/o se mezcla adecuadamente. Esta trituración y/o amasado puede alcanzarse mediante un tratamiento (corto) en un mezclador de alto cizallamiento. Opcionalmente, el o cada agente que incrementa la consistencia puede añadirse durante esta parte del procedimiento.

A continuación, la biomasa (opcionalmente triturada o amasada) puede someterse posteriormente al procedimiento de granulación para dar como resultado la formación de partículas granulares. La granulación puede efectuarse de un número de modos diferentes.

Otro método para reducir el contenido de agua (o incrementar el contenido de materia seca) es usar un lavado con sal (por ejemplo, salmuera), de la biomasa o (preferiblemente) después de la separación de la biomasa del caldo, tal como usando filtración con lavado.

En una realización preferida de la invención, la estructura y el tamaño de las partículas deseados se obtienen mediante un procedimiento de extrusión. Las características de las partículas, tales como estructura y tamaño, pueden ser importantes para optimizar el procedimiento de secado y/o extracción. Durante la etapa de secado, si las partículas son demasiado pequeñas, pueden dar problemas ya que pueden generar polvo fino y finos, mientras que las partículas demasiado grandes no se fluidizan y pueden dar un comportamiento de secado pobre. Durante la extracción, un tamaño de los gránulos demasiado pequeño puede no permitir el uso de un procedimiento de percolación, ya que la caída de presión sobre el lecho de la biomasa será demasiado alta. Demasiados finos pueden dar problemas en etapas de purificación posteriores. Un tamaño demasiado grande puede impedir la penetración eficaz del disolvente durante la extracción. Por otra parte, la estructura de las partículas debe ser suficientemente compacta para evitar la desintegración durante el secado y la extracción, pero las partículas (gránulos secados) tienen preferiblemente una porosidad que permite la penetración (eficaz) de disolvente durante la extracción.

Las condiciones de extrusión pueden ser ajustadas por un experto para obtener partículas granulares (de biomasa) que tienen la estructura y el tamaño deseados.

Las condiciones de extrusión pueden ajustarse para minimizar la ruptura de células. Una ruptura de células mínima puede asegurar una protección óptima de compuestos lábiles sensibles a la oxidación contra la degradación inducida por oxidación. La extrusión se efectúa por lo tanto preferiblemente a temperaturas inferiores, sin ningún medio de calentamiento. Preferiblemente, esto está en el intervalo de 20 a 30°C, tal como aproximadamente temperatura normal. Durante la extrusión, las partículas granulares pueden formarse naturalmente, cayendo el producto extruido por su propio peso de la hilera mediante la influencia de la gravedad, formando de ese modo partículas. Sin embargo, si la biomasa es de una naturaleza por la que después de ser extruida por hilera forma hilos largos como espagueti, entonces los espagueti pueden cortarse para dar partículas de un tamaño deseado.

Se ha encontrado que la temperatura de la biomasa influye en la naturaleza de las partículas granulares producidas durante la extrusión. Preferiblemente, la biomasa tiene una temperatura de 6 a 15°C antes de la extrusión. Sin embargo, mientras está en la extrusora, la temperatura de la biomasa puede ascender para ser de 10 a 60°C, aunque preferiblemente esta es de 15 a 30°C. El aumento de temperatura dependerá de la presión ejercida sobre la biomasa y su contenido de materia seca.

Durante la extrusión la biomasa se fuerza habitualmente a través de un tambor hacia una hilera, a menudo mediante un tornillo. Este tambor preferiblemente no está calentado. De hecho, es ventajoso que se enfríe. Adecuadamente, la

ES 2 205 202 T3

temperatura del refrigerante (por ejemplo, una solución acuosa tal como agua) es de 1 a 4°C, tal como aproximadamente 2°C.

5 En general, la extrusión no cambia el contenido de agua. Esto es por lo que en la fase (b) el contenido de materia seca es el mismo que en la fase (a). Sin embargo, como se apreciará, otras técnicas de granulación (tales como las descritas más adelante) sí cambian el contenido de agua, y pueden disminuirlo (en otras palabras, incrementan el contenido de materia seca). Para una biomasa que contiene un hongo, por ejemplo del orden *Mucorales* (en particular uno que produce un PUFA), el contenido de materia seca de la biomasa en (a), que será habitualmente el mismo que en las partículas granulares producidas durante la granulación (en este caso extrusión), está adecuadamente entre 35 y 60%, preferiblemente de 50 a 60%. Después de secar, los gránulos secos tienen preferiblemente un contenido de materia seca de al menos 90%, tal como al menos 95%.

La técnica de granulación preferida es usar una extrusora.

15 Una buena visión general de las extrusoras es realizada por W. Pietsch (“Size Enlargement by Agglomeration”: Wiley & Sons, 1991, página 385). La máquina puede ser una extrusora discontinua o continua. Para extrusoras continuas, pueden mencionarse extrusoras de un solo tornillo simples (de transporte tanto axial como radial). Además, existen extrusoras de doble tornillo co- o contra-giratorias. La biomasa que ha de extruirse se transporta, se compacta parcialmente y se prensa a través de una placa perforada (hilera). Otro grupo de extrusoras incluye máquinas de formación de pelets. Aquí, una herramienta de prensado cilíndrica gira sobre una capa de material depositada sobre una placa perforada.

25 Si los gránulos se obtienen mediante extrusión, entonces la biomasa necesita estar en una forma extruible. El contenido de agua puede ajustarse, si es necesario, dependiendo de la condición de la biomasa, los microorganismos empleados y las condiciones de extrusión. El agua puede retirarse o el contenido de materia seca incrementarse por medio de adición de sólidos, por ejemplo almidón. La biomasa puede ajustarse de este modo hasta la consistencia correcta, que es habitualmente la de una pasta.

30 Aunque los gránulos pueden usarse para la extracción del compuesto, además representan una forma estable de la biomasa que puede almacenarse. Los gránulos pueden tener otros usos: por ejemplo, pueden usarse en la preparación de una fórmula infantil, donde la biomasa contiene uno o más ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs).

35 La presente invención también prevé otros métodos de granulación que permiten la formación de partículas (granulares). Por ejemplo, un procedimiento de secado de múltiples fases pueden comprender una combinación de secado por pulverización y un lecho fluidizado y también puede dar partículas granulares.

Pueden emplearse otros tipos de técnicas de granulación. Generalmente, la granulación es la acción de obtener sólidos en una forma granular mediante aumento del tamaño o reducción del tamaño. En general, se emplea el aumento del tamaño. Una buena visión general del tipo de procedimientos de granulación disponibles se describe en W. Pietsch, “Size Enlargement by Agglomeration” (Wiley & Sons, 1991, página 385). Dentro de esto existen muchas técnicas diferentes disponibles para la granulación y esto incluye varios métodos de aglomeración, que se describirán. Aquí, la aglomeración da como resultado partículas pequeñas que se adhieren entre sí (se aglomeran) para formar partículas mayores (en este caso, las granulares). Por lo tanto, si una primera técnica da como resultado que las partículas son demasiado pequeñas, puede emplearse a continuación una técnica de aglomeración para dar partículas más grandes (granulares).

50 La aglomeración por volteo se alcanza habitualmente usando un tambor o secador cónico volteado y/o giratorio con un polvo que tiene propiedades adhesivas (de modo que las partículas se adhieren entre sí). En algunos casos, puede mezclarse un aglutinante añadido adicional. Mediante este mecanismo, pueden formarse partículas esféricas.

55 La aglomeración por presión se caracteriza habitualmente por fuerzas elevadas que actúan sobre una masa de un material en partículas. En general, este procedimiento se realiza con polvos finos o con materiales “plásticos” (no elásticos). Este procedimiento se usa normalmente para materiales en polvo (sin embargo, también se usa en la producción de levadura secada para masas de una cierta consistencia). Las partículas conformadas pueden secarse hasta un contenido de materia secada adecuado para el almacenamiento óptimo. La aglomeración por presión puede efectuarse mediante un pistón, un rodillo, prensas isostáticas y/o extrusoras. Una buena descripción de este tipo de equipo se da en el libro de Pietsch mencionado anteriormente.

60 Las prensas de extrusión hacen uso habitualmente de fricción con las paredes, provocando la resistencia al flujo del material plástico a través de los diámetros internos o las boquillas de extremos abiertos. Particularmente, en extrusoras de tornillo tiene lugar una mezclado intensiva y se aplican altas fuerzas de cizallamiento.

En general, los materiales con bajas temperaturas de fusión o plastificación pueden aglomerarse directamente.

65 Son posibles otras técnicas de aglomeración. Por ejemplo, el secado por pulverización en combinación con un aglomerador de lecho fluido. Inicialmente, la biomasa puede secarse mediante atomización a través de una tobera o usando una rueda giratoria en un secador de pulverización. Las partículas finas se reciclan a la sección de pulverización. El polvo pegajoso resultante se aglomera adicionalmente en una sección de lecho fluido. En algunos casos, la nueva

ES 2 205 202 T3

mojadura del polvo puede mejorar el procedimiento de aglomeración. Esta técnica descrita se conoce como secado en múltiples fases.

5 Para describir el secado en múltiples fases con más detalle, la biomasa se seca por pulverización en primer lugar. Esto puede dar un polvo fino. La temperatura del secado por pulverización (temperatura de entrada de aire) es habitualmente de 160 a 260°C y/o la temperatura de salida del aire es de 75 a 90°C. Aquí, la biomasa se pulveriza mediante un disco que gira rápidamente o una tobera que genera partículas pequeñas. Las partículas pueden caer a continuación, bajo gravedad, hacia el fondo de una torre de secado por pulverización. Aquí, puede proporcionarse un lecho fluido, que puede usar aire caliente para efectuar el secado (habitualmente a de 90 a 95°C). Aquí, puede tener lugar la aglomeración y las partículas pueden adherirse entre sí. Después de esto, las partículas aglomeradas (granulares) se someten a secado, por ejemplo sobre un lecho de secado de correa o sobre un lecho sub-fluidizado. Al principio del procedimiento, una biomasa puede tener un contenido de materia seca por debajo de 30%. Después del secado por pulverización, este puede incrementarse hasta desde 75 a 90% y después de la aglomeración puede ser de 90 a 95%. Después del secado, este puede incrementarse hasta al menos 95%.

15 Otra técnica es usar un aglomerador de lecho fluidizado. Aquí, el polvo puede fluidizarse en un flujo gaseoso. En el lecho de partículas se pulveriza un fluido con agua que moja el polvo y mejora la aglomeración.

20 En general, los procedimientos de aglomeración descritos son para polvos secos que pueden plastificarse. Una excepción es el secado sobre un secador de múltiples fases. Esta combinación de secado por pulverización en combinación con un lecho fluido después del secador es adecuada para la aglomeración de muchos tipos diferentes de biomasa. Sin embargo, el procedimiento no siempre es adecuado para productos termolábiles o productos susceptibles a la oxidación por aire (caliente). Un buen modo de producir una biomasa seca granulada es la extrusión de una torta filtrante deshidratada mecánicamente seguido por una etapa de secado adecuada como secado en lecho fluido o lecho sub-fluidizado.

25 Otro modo de aglomeración de biomasa (secada) puede realizarse mediante la nueva mojadura de un producto secado (por pulverización) seguida por una etapa de extrusión y nuevo secado en, por ejemplo, un secador de lecho fluido. Los polvos, con un punto de fusión bajo o una temperatura de plastificación baja (o, en el caso de ciertas biomásas secadas con una alta cantidad de aceite intracelular, que se funde parcialmente debido a las fuerzas en la extrusora), pueden extruirse. Se forman pelets adecuados en la hilera.

30 Como en (c) anteriormente, la biomasa granulada (extruida o de otro modo) puede secarse, adecuadamente bajo condiciones que permiten que las partículas queden intactas. Se cree que la estructura y el tamaño de las partículas de la biomasa después del procedimiento de granulación permite el secado eficaz de la biomasa. El secado puede realizarse usando diversos secadores, por ejemplo un secador de correa, un secador a vacío o de correa a vacío, un secador de lecho fluidizado o sub-fluidizado. El experto puede elegir entre un procedimiento discontinuo o uno continuo.

40 El uso de un secador de lecho fluidizado o subfluidizado se prefiere especialmente en el procedimiento de la invención. El secado puede producirse en aire o bajo nitrógeno. Con el secado en lecho fluidizado y subfluidizado, la temperatura en el lecho puede ajustarse hasta valores prefijados. Estos valores pueden variar ampliamente, por ejemplo de 35°C a 120°C, tal como 50 a 90°C, opcionalmente de 60 a 80°C. Si un compuesto lábil necesita aislarse de la biomasa, la temperatura del procedimiento de secado puede ajustarse fácilmente hasta intervalos inferiores, para disminuir el riesgo de oxidación o degradación.

45 Alternativamente o además, puede emplearse un procedimiento de secado a vacío, por ejemplo en de 1 a 2 horas.

50 Pueden surgir varias ventajas de la etapa de secado. En primer lugar, el secado de las partículas de la biomasa (para formar gránulos) puede dar como resultado un material intermedio que puede almacenarse establemente durante un período de tiempo prolongado. Aquí, un contenido de materia seca (relativamente) alto de la biomasa puede evitar la degradación del compuesto que ha de aislarse de la biomasa. De este modo, los gránulos secados pueden considerarse como una formulación estable del compuesto presente dentro de o asociado con la biomasa.

55 Por ejemplo, los gránulos pueden funcionar como un portador para una enzima, con lo que la enzima se inmoviliza dentro de los gránulos al mezclar una cantidad apropiada de un agente de reticulación, por ejemplo glutaraldehído, en la biomasa antes de la extrusión.

60 Además, los gránulos secados preparados de acuerdo con la invención pueden usarse ventajosamente según están, por ejemplo como una composición o un aditivo para alimentos o piensos.

Las partículas y/o los gránulos (por ejemplo, producidos mediante extrusión) pueden tener las siguientes propiedades.

65 Los gránulos pueden tener la conformación de confeti de chocolate. El diámetro de los gránulos (extruidos) puede variar de 0,1 a 12 mm, tal como de 0,3 a 10 mm. Se prefiere más de 1,5 mm a 6 mm y opcionalmente (para la extracción cuando están secos) el diámetro es de 2 a 3 mm. La longitud de los gránulos puede ser aproximadamente 2 a 5 ó 6 veces el diámetro. Entonces pueden manejarse fácilmente en el envasado y usarse con extractores disponibles comercialmente (para garantizar la permeabilidad del lecho). Habitualmente, la mayoría de, si no sustancialmente

ES 2 205 202 T3

todos, los gránulos tendrán el mismo tamaño, en efecto, pueden obtenerse gránulos altamente uniformes u homogéneos cuando al menos 80%, tal como al menos 90%, de todos los gránulos tiene una propiedad particular dentro del intervalo especificado.

5 Las composiciones del segundo aspecto (los gránulos) preferiblemente fluyen libremente. Pueden ser de conformación aproximadamente cilíndrica. Esto puede alcanzarse al usar extrusión. Las partículas pueden ser entonces de un diámetro que es aproximadamente el mismo (aunque puede ser ligeramente mayor) que los agujeros de la hilera usada para la extrusión. Durante este procedimiento, las partículas pueden formarse automáticamente al salir de la hilera. En cualquier caso, la longitud de las partículas será variable. Sin embargo, la longitud de las partículas puede influirse, 10 por ejemplo, si se usa un medio de corte, por ejemplo una cuchilla (por ejemplo uno o más álabes giratorios adyacentes a la hilera) cuando la mayoría (si no la totalidad) de las partículas tendrán sustancialmente la misma longitud. Longitudes preferidas de tales partículas son al menos 2 mm, tal como al menos 3 mm. Adecuadamente, los gránulos son de un tamaño y un contenido de agua que permiten que sean “vertidos”, lo que permite que sean almacenados y transportados más fácilmente. Aunque, en general, la mayoría de las partículas será de naturaleza alargada, algunas 15 pueden ser aproximadamente esféricas. El contenido de lípidos preferido de los gránulos es preferiblemente de 30 a 50% en peso.

La densidad aparente de los gránulos será habitualmente de 400 a 1100 kg/m³.

20 Como se ha analizado, los gránulos son preferiblemente porosos, para permitir el acceso del disolvente al compuesto que ha de extraerse. Preferiblemente, los gránulos tienen canales huecos, y estos pueden extenderse hacia, y dentro de, el centro de los gránulos. El número de canales puede ser tal que de 40 a 60%, tal como de 45 a 55%, óptimamente aproximadamente 50%, en volumen del gránulo sea hueco (aire). En cuanto a los canales, pueden ser de una longitud 10 a 20 veces mayor que la de su diámetro medio. Los gránulos, en general, serán homogéneos en 25 su composición ya que el exterior de los gránulos será en esencia el mismo material que el del centro. Esto está en contraste con composiciones de levadura de la técnica anterior que pueden tener un exterior relativamente sólido pero sin embargo un centro relativamente hueco.

Los gránulos pueden almacenarse establemente a una temperatura óptima para el compuesto que ha de extraerse 30 finalmente.

El contenido de materia seca preferido de los gránulos secados es mayor que 80%, más preferiblemente al menos 85%, lo más preferiblemente al menos 90% y óptimamente en el intervalo de 93 a 97%. Si ha de usarse para la extracción un disolvente miscible con agua, pueden usarse gránulos con contenidos de materia seca inferiores. 35

Los gránulos (secados) son así habitualmente porosos de modo que los disolventes usados en la extracción pueden alcanzar un acceso fácil a los (al interior de los) gránulos. Así, durante la extrusión y el secado, la cantidad de polvo fino puede minimizarse (lo que incrementa el rendimiento) y puede evitarse una filtración adicional del extracto (de disolvente) antes de la evaporación del extracto. 40

La porosidad de los gránulos depende del contenido de (agua o) materia seca de las partículas granulares. A menudo, el agua en las partículas granulares se evaporará durante el secado para dejar un poro (hueco). La porosidad de las partículas secadas es preferiblemente de 15 a 50%, tal como de 20 a 40%, óptimamente de 25 a 35%. Las medidas de la porosidad se describen más adelante (Ejemplo 25). 45

Preferiblemente, la mayoría (si no la totalidad) de las células en los gránulos están intactas (es decir, no están rotas). Los gránulos, especialmente de una biomasa fúngica, pueden ser totalmente partículas de biomasa que tienen un diámetro de 0,3 a 10 mm, preferiblemente un diámetro de 0,7 a 5 mm, opcionalmente de 1 a 3 mm. Comúnmente, las partículas se formarán automáticamente con la longitud deseada. De otro modo, las partículas pueden cortarse 50 hasta la longitud deseada. Si la granulación era mediante extrusión, entonces los agujeros en la hilera de la extrusora pueden corresponder generalmente a los diámetros de los gránulos.

Opcionalmente, pueden añadirse antioxidantes antes o durante el procedimiento de granulación. Estos pueden incluir tocoferol y palmitato de ascorbilo, por ejemplo presentes en hasta 0,1% (en peso). 55

La invención puede proporcionar así un material de biomasa con características que pueden permitir una extracción económica y eficaz de compuestos. El compuesto o los compuestos presentes pueden a continuación purificarse, aislarse o (preferiblemente) extraerse. El procedimiento de esta invención puede permitir el uso de un procedimiento de extracción por percolación. La ventaja permitida por este procedimiento de extracción parece deberse a la estructura y el tamaño así como a un alto contenido de materia seca. Un producto extruido seco requiere una cantidad reducida de disolvente para la extracción del compuesto valioso de él. Además, el procedimiento de tueste de desolventización, es decir, la liberación del disolvente usado de la biomasa, puede realizarse mejor y más eficazmente con la biomasa en la forma de un producto extruido. 60

El residuo del producto extruido obtenido después del procedimiento de tueste de desolventización puede usarse ventajosamente como un componente para piensos. 65

ES 2 205 202 T3

Un contenido de materia seca del producto extruido que supera 90 a 95% puede permitir el almacenamiento estable del producto extruido, mientras que un contenido de materia seca por encima de 85% ya puede dar una ventaja significativa en el procedimiento de extracción posterior.

5 La extracción se efectúa preferiblemente usando un disolvente. El disolvente empleado dependerá del compuesto que ha de extraerse, pero en particular pueden mencionarse ésteres alquílicos C_{1-10} (por ejemplo acetato de etilo o butilo), tolueno, alcoholes C_{1-6} (por ejemplo metanol, propanol) y alcanos C_{3-8} (por ejemplo hexano) y/o un fluido supercrítico (por ejemplo CO_2 líquido o propano supercrítico). En técnicas previas, el disolvente se ha empleado directamente sobre el microorganismo en el caldo. Sin embargo, realizando la extracción sobre los gránulos puede reducirse significativamente la cantidad de disolvente requerida. En algunos de los experimentos de los solicitantes, era necesario de 20 a 30 veces menos disolvente para realizar la extracción. No sólo esto da como resultado un ahorro económico significativo, debido a que se usa menos disolvente, sino que también minimiza problemas de emisiones. Al usar gránulos, la superficie específica disponible al disolvente puede ser particularmente alta y por lo tanto pueden obtenerse buenos rendimientos.

15 Si el compuesto que ha de extraerse es hidrófobo, entonces se usa preferiblemente un disolvente apolar. Para compuestos hidrófilos, se emplea adecuadamente un disolvente polar (tal como un alcohol).

20 La extracción puede efectuarse usando una variedad de técnicas. El método preferido es la extracción por percolación, usando un filtro. Aquí, una columna puede rellenarse con los gránulos secados. El disolvente (hexano) se añade a continuación para cubrir los gránulos. Aunque el disolvente puede hacerse pasar una vez a través de la columna y sobre los gránulos secados, preferiblemente se recircula (como un sistema cerrado o abierto). Adecuadamente, el disolvente se recircula de 3 a 7 veces, tal como aproximadamente 5 veces, adecuadamente durante un período de tiempo desde media hora hasta una hora y media, tal como aproximadamente una hora. La Figura 3 muestra un aparato de extracción por percolación adecuado. El disolvente se mantiene en el recipiente antes de la adición al extractor de percolación que contiene los gránulos deseados. El disolvente se hace circular por medio de la bomba. El filtro de acabado está destinado a retirar finos.

30 Pueden emplearse otros extractores de percolación. Estos pueden ser de un diseño de contracorriente o corriente cruzada. En el primero, los gránulos secados pueden mantenerse en un tambor giratorio (tal como un carrusel) dividido en diversos sectores. El disolvente se hace pasar a través de los gránulos en un sector en una dirección, y a continuación se hace pasar a través de (preferiblemente en la misma dirección) los gránulos en otro sector (tal como uno vecino). Estas máquinas se denominan a menudo extractores de carrusel y están disponibles de Krupp, Alemania.

35 En otra técnica, los gránulos pueden ponerse sobre, por ejemplo, una correa o un transportador móvil (por ejemplo, poroso) que se mueve en una dirección sustancialmente opuesta al disolvente. Esto puede significar que los gránulos recientes se extraen con disolvente que ya ha pasado a través de otros gránulos, y que se aplica disolvente reciente a los gránulos que previamente se han sometido a extracción con el disolvente. Esta disposición puede maximizar la eficacia.

40 En una técnica de corriente cruzada, partidas separadas de los gránulos se someten a extracción con porciones de disolvente reciente.

45 El procedimiento de la invención también puede usarse para obtener una mezcla de dos o más compuestos a partir de diferentes microorganismos al preparar partículas granulares o gránulos a partir de una mezcla de dos o más microorganismos. Esta mezcla de microorganismos puede obtenerse al mezclar los caldos de fermentación de dos o más microorganismos diferentes directamente después de que haya acabado o al combinar la biomasa de dos o más microorganismos inmediatamente antes de la granulación (por ejemplo, procedimiento de extrusión). También es posible mezclar dos o más productos extruidos microbianos diferentes antes del procedimiento de extracción.

50 Un procedimiento preferido de acuerdo con la presente invención puede así ser como sigue:

- 55 a) fermentar uno o más microorganismos en un medio adecuado, bajo condiciones que permiten que el microorganismo produzca el compuesto deseado, lo que puede dar como resultado un caldo (de los microorganismos en el medio circundante);
- b) si es necesario, precipitar o solidificar el compuesto, tal como mediante acidificación;
- 60 c) separar los microorganismos del medio en el caldo, lo que puede alcanzarse mediante separación sólido/líquido, tal como mediante filtración, para obtener una biomasa;
- d) pasteurización, del caldo resultante de (a) o de la biomasa resultante de (c);
- 65 e) si es necesario, incrementar el contenido de materia seca de la biomasa, por ejemplo al añadir materias o sustancias secas, o al disminuir el contenido de agua, por ejemplo mediante una técnica de deshidratación o secado;

ES 2 205 202 T3

f) triturar y/o amasar la biomasa resultante (y, opcionalmente, incrementar el contenido de materia seca al añadir una o más sustancias secas);

g) granular la biomasa para dar partículas granulares, tal como mediante extrusión;

h) secar las partículas granulares para dar gránulos secados; y

i) extraer uno o más de los compuestos, tal como al usar un disolvente adecuado.

Los compuestos aislados de acuerdo con la invención pueden ser de alta calidad y pueden ser adecuados para usar en la nutrición de seres humanos o animales. Especialmente, los lípidos que contienen ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) aislados de acuerdo con la invención son adecuados con propósitos nutricionales, en particular para la incorporación en fórmulas infantiles.

La invención se describirá ahora, a modo de ejemplo, con respecto a los siguientes Ejemplos que se proporcionan a modo de ilustración. Están acompañados por los siguientes dibujos, en los que:

la Figura 1 es una gráfica de temperatura y materia seca (%) frente al tiempo, que muestra el comportamiento de secado de diferentes cantidades de biomasa extruida a diferentes temperaturas;

la Figura 2 es una gráfica de rendimiento de aceite frente a la temperatura, que muestra biomasa extruidas a diferentes temperaturas;

la Figura 3 es un diagrama de flujo de un procedimiento de extracción por percolación (conocido);

la Figura 4 es una gráfica del rendimiento de aceite frente al tiempo, que muestra la relación entre la cantidad de aceite extraído y su momento de extracción; y

las Figuras 5 y 6 son gráficas de la distribución por tamaños de gránulos secados de acuerdo con la invención y gránulos de la técnica anterior, respectivamente.

Ejemplos 1 a 6

Procesamiento de caldo de fermentación de Mortierella

Se filtraron 160 l de un caldo de fermentación de *Mortierella alpina*, previamente pasteurizado (68°C durante 1 hora) (crecimiento en forma de pelets), en una prensa filtrante de platos y marcos Dieffenbach estándar (tipo de tela: nycot 2794). El caldo se filtró con una presión aplicada máxima de 1,0 bares. En 20 minutos, se filtraron 160 l de caldo sobre un área de filtro total de 4,35 m², lo que daba como resultado un flujo medio de aproximadamente 110 l/m²h. La torta filtrante se lavó con aproximadamente 3 volúmenes de torta (≈ 150 l) de agua de procesamiento.

Se recuperaron aproximadamente 30 kg de torta mojada con un contenido de materia seca de aproximadamente 25%. Se emplearon tres tipos de procedimiento de secado.

Secado a vacío

Se secaron 10 kg de torta filtrante bajo vacío a 35°C en un secador de bandejas de vacío (aproximadamente 50 mbar) (aproximadamente 1 m² de superficie de secado) durante 24 horas, dando como resultado aproximadamente 2,5 kg de biomasa secada con un contenido de materia seca de aproximadamente 94%. La biomasa secada consistía en biomasa triturada y algunos grumos grandes. El secado a vacío llevaba mucho tiempo probablemente debido a los grumos grandes.

Secador de bandejas con ventilación

Se secaron 10 kg de torta filtrante bajo nitrógeno durante 24 horas a 35°C en un secador de bandejas con ventilación (aproximadamente 1 m² de superficie de secado). En total, se recuperaron aproximadamente 2,5 kg de biomasa secada con un contenido de materia seca de aproximadamente 93%. La biomasa secada consiste en biomasa triturada y algunos grumos grandes. El secado con bandejas con ventilación llevaba mucho tiempo probablemente debido a los grumos grandes.

Secador de lecho fluido

Se secaron 5 kg de torta filtrante en un secador de lecho fluido a escala de laboratorio de AEROMATIC (tipo MP-1) con una temperatura del aire de entrada de aproximadamente 200°C. La temperatura de salida era aproximadamente 4°C. En aproximadamente 45 minutos, la biomasa mojada se secó dando como resultado aproximadamente 1 kg de biomasa secada con un contenido de materia seca de aproximadamente 81%.

ES 2 205 202 T3

El material secado recuperado mediante este último método se usó para la extracción de aceite por medio de hexano a seis temperaturas diferentes (de ahí los Ejemplos 1 a 6). Se sometieron a extracción 150 g de la biomasa secada, con 1500 ml de hexano (calentado hasta reflujo) bajo una atmósfera de nitrógeno durante 90 minutos. La masa de células se separó por filtración y el disolvente en las micelas resultantes se evaporó en un rotavapor bajo vacío. Esto daba como resultado un aceite de PUFA en bruto. Los resultados se muestran en la Tabla 1. La extracción a temperatura ambiente daba rendimientos inferiores. Se obtuvieron rendimientos mejores a temperaturas elevadas.

TABLA 1

Extracción de aceite de una biomasa

Experimento número	Relación de biomasa/hexano	Temperatura en °C	Tiempo de extracción en minutos	g de aceite por 100 g de biomasa secada
1	300	80	30	19,2
2	100	23	30	16,4
3	150	45	60	22,6
4	200	23	120	17,1
5	200	23	30	11,8
6	100	23	120	13,5

El aceite rico en triglicéridos era un aceite amarillo claro y contenía algo de material sólido.

Ejemplo 7 y ejemplo comparativo 8

Procesamiento de caldo de fermentación de Mortierella

Se filtraron 500 l de caldo (previamente pasteurizado como se describe en el Ejemplo previo) en una prensa de filtro de membrana (SCHULE) con una diferencia de presión de aproximadamente 0,5 bares. La torta filtrante se lavó con 10 volúmenes de torta de agua de procesamiento y a continuación se escurrió durante 30 minutos a 5,5 bares. La torta resultante tenía un contenido de materia seca de aproximadamente 46%. La torta recuperada de este modo se extruyó en una extrusora piloto (ODEKERKE, diámetro del tambor de 50 mm, tambor perfilado). La hilera tenía 10 agujeros con un diámetro de 1,6 mm cada uno. En total, se extruyeron 19 kg de torta filtrante en aproximadamente 45 minutos.

El producto extruido recuperado de este modo se secó con un secador de lecho fluido de planta piloto (T4 AEROMATIC, 0,26 m² de superficie de secado). En aproximadamente 45 minutos, el producto extruido se secó a 65°C, dando como resultado un contenido de materia seca de aproximadamente 85% (Ejemplo 7).

Durante el mismo experimento, algo de torta filtrante no se extruyó (Ejemplo Comparativo 8) y se secó en un secador de bandejas a vacío a 40°C. El secado llevaba mucho tiempo debido a los grumos grandes.

Ambos materiales se sometieron a extracción usando hexano. Se encontraron las siguientes características de los materiales:

- | | |
|----------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| producto extruido secado:
(Ejemplo 7) | principalmente pelets
procedimiento de extracción
razonablemente fácil |
| Biomasa secada a vacío:
(Ejemplo Comparativo 8) | pelets y grumos, muchos finos
procedimiento de extracción
difícil; propiedades de
filtración pobres |

ES 2 205 202 T3

Ejemplos 9 y 10

Se realizaron experimentos de extrusión usando el mismo caldo del Ejemplo 7, usando las siguientes extrusoras:

5 LALESSE (Arnhem, Países Bajos)

En el Ejemplo 9, se usó una extrusora universal de un solo tornillo LALESSE. Este tipo de extrusora se usa normalmente en la producción de aperitivos. Se alimentó en primer lugar maíz triturado (contenido de materia seca de aproximadamente 95%) como una prueba a la extrusora y bajo presión y calor el maíz se extruyó; una vez fuera de la boquilla el producto extruido se expandió.

El tambor de este tipo de extrusora era un tambor perfilado para transportar el maíz procesado. El tipo de tornillo usado en la extrusión depende del tipo de material procesado. El tornillo era un tornillo de transporte universal o un tornillo de compresión con un diámetro de 48 mm. La máquina LALESSE es una máquina piloto de 7,5 Kw (capacidad de empuje). El requerimiento de energía total de la máquina es 12,1 Kw. El tambor de la extrusora podía calentarse o enfriarse. Se usaron hileras con de 1 a 4 agujeros con diámetros de 1,8, 2,0 y 2,2 mm durante la extrusión de la biomasa.

La capacidad para extender la biomasa de *Mortierella* (tambor enfriado) era aproximadamente 40 kg/h. En la extrusión, la relación longitud/diámetro (L/D) del agujero en la hilera se variaba.

ALMEX (Zutphen, Países Bajos)

En el Ejemplo 10, usando la biomasa de *Mortierella* del Ejemplo 7, se usó una extrusora expansora de la compañía ALMEX. Este tipo de extrusora se usa en la producción de alimento para mascotas. Tenía un tambor liso con pernos que permitían el transporte de la biomasa. Estos pernos tienen la misma función que los perfiles en el tambor de la extrusora LALESSE. El tornillo de la extrusora expansora era un tornillo modular.

30	Datos técnicos:	ALMEX Contivar 150
		L/D de 10 (relación de la longitud del tornillo y el diámetro del tornillo)
		Velocidad máxima del tornillo de 180 rpm
35		22 Kw (capacidad de empuje)
		Diámetro del tornillo de 150 mm
		Enfriamiento con agua corriente
40		Hileras: 3 anillos de agujeros, cada agujero con un diámetro de 1,8 mm

La biomasa se elevó hasta aproximadamente 25°C de temperatura durante el procesamiento. La capacidad de la máquina era aproximadamente 250 kg de producto extruido de *Mortierella* por hora.

Ejemplo comparativo 11

Comparación de la separación sólido/líquido realizada con diferentes métodos

Decantador

Se decantaron 350 l de caldo obtenido a partir de una fermentación de *Mortierella alpina* en el decantador "FLOTTWEG" (tipo Z 23-3/441). La velocidad se fijó a aproximadamente 4000 rpm. El intervalo de velocidad diferencial se varió durante la operación de 7,5-20 rpm.

La alimentación se fijó en 400 l/h. La biomasa no se lavó. En total, se decantaron 350 l de caldo. La temperatura de la alimentación era 8°C y la del sobrenadante 15°C. El contenido de materia seca de la biomasa recuperada era aproximadamente 25%.

Decantador + filtro de tambor a vacío

Se suspendieron 20 kg de la biomasa del experimento del decantador anterior con un contenido de materia seca de 25% en 500 ml de agua de procesamiento en la que estaban disueltos 10 kg de NaCl. La suspensión resultante se filtró en un filtro de tambor a vacío con descarga en correa (PAXMAN, tipo tela: 865.912 K/5 polyprop) sin lavado adicional. La velocidad del tambor se fijó a 1 rpm y la diferencia de presión a un máximo de 600 mbar. En total, se filtraron 400 l en 15 minutos. La superficie de filtración neta era aproximadamente 0,3 m², lo que daba como resultado un flujo medio de 5000 l/m²h (superficie filtrante). La velocidad de filtración era muy buena pero la "formación de la torta" era bastante mala. El contenido de materia seca de la biomasa filtrada recuperada era aproximadamente 35%.

ES 2 205 202 T3

Prensa filtrante de platos y marcos

Se filtraron 500 l de caldo en una prensa filtrante de platos y marcos (R&B estándar, tipo tela: nycot 2794). El caldo se filtró con una diferencia de presión de 0,3 bares. En 35 minutos, se filtraron 500 l de caldo sobre un área filtrante total de 5 m², lo que daba como resultado un flujo medio de ± 175 l/m²h. La torta filtrante se lavó en 30 minutos con aproximadamente 2,5 volúmenes de torta de agua de procesamiento, lo que daba como resultado un flujo medio de 400 l/m²h.

La torta se secó por inyección con aire durante 30 minutos, lo que daba como resultado un contenido de materia seca de la biomasa recuperada de aproximadamente 25%.

Prensa filtrante de membrana

Se filtraron 700 l de caldo en una prensa filtrante de membrana (SCHULE, tipo de tela: propex 46K2). El caldo se filtró con una diferencia de presión de 0,3 bares. En 30 minutos, se filtraron 700 l de caldo sobre un área filtrante total de 6,8 m², lo que daba como resultado un flujo medio de aproximadamente 205 l/m²h.

La torta filtrante se lavó en 7 minutos con 3 volúmenes de torta (≈ 300 l) de agua de procesamiento, lo que daba como resultado un flujo medio de 373 l/m²h.

La ventaja de una prensa filtrante de membrana sobre una prensa de platos y marcos es que la torta después de la filtración puede escurrirse a alta presión, de modo que el contenido de materia seca de la torta se incrementa. La torta se escurrió a 5,5 bares durante 30 minutos, lo que daba como resultado un contenido de materia seca de la biomasa recuperada de aproximadamente 45%.

En otro experimento, se filtraron 1100 l de caldo en una prensa filtrante de membrana (SCHULE, tipo de tela: propex 46K2). El caldo se filtró con una diferencia de presión de 0,3 bares. En 45 minutos, se filtraron 1100 l de caldo sobre un área filtrante total de 12,3 m², lo que daba como resultado un flujo medio de aproximadamente 120 l/m²h. La torta filtrante se lavó en 18 minutos con 3 volúmenes de torta (≈ 600 l) de una solución de NaCl al 1%, lo que daba como resultado un flujo medio de 162 l/m²h.

La torta se escurrió a 6 bares durante 30 minutos, lo que daba como resultado un contenido de materia seca de la torta filtrante recuperada de aproximadamente 55%.

Tanto el escurrimiento como el lavado de la torta con una solución salina al 1% tenían un efecto significativo sobre el contenido de materia seca de la torta filtrante.

Ejemplo 12

Extrusión de biomasa con diferentes contenidos de materia seca

La extrusión se realizó con biomazas con diferentes contenidos de materia seca, que se obtuvieron mediante el método presentado en el Ejemplo 7 (véase la Tabla 2). La extrusión se realizó usando una extrusora de un solo tornillo con un tambor perfilado y un tornillo universal. Las hileras aplicadas en la extrusión tenían un número de agujeros diferente y los diámetros de los agujeros estaban en el intervalo de 2 mm.

El diámetro de las partículas obtenidas después de la extrusión era aproximadamente 2 mm.

El comportamiento y la calidad del producto extruido depende del porcentaje de materia seca de la biomasa usada para la extrusión. Aunque 25% de materia seca daba los resultados más pobres, para otros microorganismos, tal contenido de materia seca bajo puede ser aceptable.

55

60

65

ES 2 205 202 T3

TABLA 2

Resultados de experimentos de extrusión con biomasa con diferentes contenidos de materia seca

%	Comportamiento de extrusión	Calidad del producto extruido
25	malo	material muy pegajoso
35	bueno	material pegajoso
45	muy bueno	producto extruido no pegajoso
55	muy bueno	producto extruido suelto

20 Ejemplos 13 y 14 y ejemplo comparativo 15

Secado de biomasa convencional y extruida de Mortierella alpina

Secado a vacío

25 Se secó biomasa recuperada convencionalmente (Ejemplo Comparativo 15, no extruida) en un secador de bandejas a vacío, pero llevaba aproximadamente 50 horas a 40°C. El secado era muy lento debido a los grumos. El contenido de materia seca de biomasa secada de este modo era aproximadamente 92,5%.

30 Para comparación, aproximadamente 20 g de producto extruido (del Ejemplo 11, $\varnothing_{particula}$ de 2 mm) con un contenido de materia seca de 55% se secó a escala de laboratorio en un rotavapor. La temperatura del baño de agua era 68°C y la presión aplicada 40 mbar. El comportamiento del secado era razonable, excepto que la biomasa secada se pegaba a la pared y exudaba un poco de aceite. El contenido de materia seca después del secado era 92,3%.

35 *Secado en lecho fluidizado*

40 En el Ejemplo 13, el secado se realizó con biomasa (Ejemplo 1) a diferentes temperaturas. Cuando no se ha producido pretratamiento de la biomasa, los grumos grandes de biomasa no se secaban completamente. En este caso, la biomasa secada era muy heterogénea considerando el tamaño de las partículas.

Si la biomasa se pretrataba antes de secar por medio de extrusión, el comportamiento de secado mejoraba sustancialmente. En este caso, el tamaño de las partículas de la biomasa secada era más uniforme.

45 La conclusión de estos resultados es que el secado en lecho fluidizado puede realizarse con diferentes formas de biomasa aislada, pero que el secado se mejorará usando un producto extruido.

50 En otro experimento (Ejemplo 14), el secado de diferentes cantidades (15 y 30 kg) de producto extruido se realizó en un secador de lecho fluidizado con aire (8000 Nm³/m²h). Durante el secado, se tomaron muestras y se calculó el contenido de materia seca. En la Fig. 1, se muestra la relación entre la temperatura y el contenido de materia seca de las (dos) cantidades diferentes.

La temperatura del lecho se fijó a 80°C. El diámetro de la biomasa extruida era 1,3 mm. El contenido de materia seca de la biomasa extruida después del secado era aproximadamente 96%.

55 Ejemplo 16

Extracción de lípido de producto extruido secado de Mortierella alpina

Extracción agitada de producto extruido secado a diferentes temperaturas

60 Se extrajeron muestras de 100 g de producto extruido secado con, respectivamente, 93,4 y 97,8% de materia seca, durante 3 horas con 500 ml de hexano o 500 ml de propanol-2, a temperaturas de 20°C, 35°C y 50°C para hexano y 20°C, 40°C y 70°C para propanol-2. La suspensión se agitó por medio de un agitador de dos álabes en un matraz de fondo redondo de "cuatro bocas" y se calentó por medio de una manta calentadora. Finalmente, el hexano o el propanol-2 evaporado se recicló por medio de un enfriador de reflujo.

65 Durante la extracción, cada 30 minutos se tomó una muestra de 15 ml del sobrenadante desde el matraz, después

ES 2 205 202 T3

de que el agitador se detuviera y las partículas se hubieran sedimentado. Se pipeteó 1 ml de las muestras a tubos de Eppendorf de 2 ml procesados. Después del secado durante la noche bajo vacío a 40°C, los tubos de Eppendorf se pesaron y el aceite total se calculó.

5 Los resultados de los experimentos se muestran en la Fig. 2.

Conclusión para la extracción con hexano

- 10 - la temperatura no tenía efecto sobre la cantidad total de lípido que puede extraerse, es decir, una temperatura de extracción relativamente baja da un buen rendimiento de lípido,
- la temperatura tenía sólo un pequeño efecto sobre el tiempo en el que puede extraerse la cantidad total de lípido,
- 15 - la cantidad total de lípido se extrajo en 30 minutos de la biomasa, con 5 volúmenes de hexano a una temperatura por encima de 20°C.

Conclusión para la extracción con propanol-2

- 20 - la temperatura tenía un efecto significativo sobre la cantidad total de lípido que puede extraerse,
- la temperatura tenía un efecto significativo sobre el tiempo en el que puede extraerse la cantidad total de lípido,
- la cantidad total de lípido se extrajo en 2 horas de la biomasa con 5 volúmenes de propanol-2 a 73°C.

25 La composición del aceite dependía del disolvente usado en la extracción (véase la Tabla 3). Cuanto más polar es el disolvente de extracción, más fosfolípidos se extraían. La polaridad del disolvente puede elegirse para optimizar la composición del aceite.

TABLA 3

30 *Extracción de biomasa de Mortierella secada a temperatura normal usando dos disolventes diferentes*

Sustancia	Aceite para hexano	Aceite para propanol-2
35 Triglicéridos	93%	85%
Diglicéridos	2%	2%
40 Monoglicéridos	2%	2%
Esteroles	3%	3%
45 Fosfolípidos	2%	6,5%

A mayor escala, se observaron problemas con la filtración de las micelas, debido a la desintegración del producto extruido en pequeñas partículas debido a la alta velocidad del agitador durante el procedimiento de extracción.

50 Estos problemas se evitaron usando extracción por percolación en lugar de extracción agitada.

Extracción por percolación de producto extruido secado, con hexano

55 Se realizaron varias extracciones por percolación a escala piloto (véase la Fig. 3 para un diagrama del procedimiento). Se extrajeron con hexano aproximadamente 40-45 kg de biomasa extruida secada (relación inicial de hexano/biomasa de 4,4 l/kg) a 20°C. El flujo de la bomba de engranajes se fijó a 1,5 m³/h. Había una pequeña purga de nitrógeno sobre el recipiente de contención de aproximadamente 0,1 bares.

60 La extracción se realizó durante 4 horas (incremento de temperatura durante la extracción de 18 a 25°C). Cada 30 minutos se tomaron muestras de las micelas. De cada muestra, se evaporaron 100 ml a escala de laboratorio en un rotavapor (T_{baño de agua} era 64°C) durante 20 minutos bajo vacío (aproximadamente 50 mbar). La cantidad de aceite se estimó. Los resultados se presentan en la Fig. 4. Puede apreciarse que después de 2 horas se alcanzaba un "equilibrio". A continuación, la biomasa extraída se lavó con aproximadamente 0,6 volúmenes de lecho de hexano. Durante la extracción, la altura del lecho no cambiaba.

65 Las micelas se sometieron a una filtración de acabado antes de la evaporación. Durante la extracción, se apreció que las micelas se hacían más y más claras, debido a la filtración profunda sobre el lecho de partículas.

ES 2 205 202 T3

Ejemplo 17 y ejemplo comparativo 18

Recuperación de aceite de β -caroteno de Blakeslea trispora

5 Se recogieron 10 l de un caldo de fermentación del hongo *Blakeslea trispora*, previamente pasteurizado (75°C durante 15 minutos), usando un equipo de filtración de laboratorio. Para mejorar la capacidad de filtración del caldo, se añadió CaCl_2 (concentración final de 5 g/l). De este modo, la biomasa recuperada se deshidrató mecánicamente (se escurrió) a escala de laboratorio hasta un contenido de materia seca de 45% usando una prensa para frutas típica (prensa para cítricos, HAIFCO D.G.M.). La torta recuperada de este modo se extruyó por medio de una jeringa de
10 acero inoxidable equipada con una hilera con 4 agujeros de 1,8 mm de diámetro cada uno. El producto extruido resultante se secó en un secador de lecho fluido a escala de laboratorio ($T_{\text{aire}} = 40^\circ\text{C}$, tiempo de secado de 90 minutos, flujo de aire de $150 \text{ Nm}^3/\text{h}$, AEROMATIC MP-1). El contenido de materia seca de la biomasa secada de este modo era aproximadamente 95%.

15 Una muestra de aproximadamente 50 g de producto extruido secado se extrajo usando extracción por percolación con acetato de etilo (relación de volumen inicial/biomasa de 30 l/kg). Después de 2 horas de extracción a 50°C , el extracto se recogió por medio de filtración a vacío. La biomasa se lavó con un volumen de lecho de acetato de etilo. El extracto recuperado de este modo se lavó dos veces con agua desmineralizada (relación extracto/agua de 5 v/v) antes de la evaporación. El acetato de etilo se evaporó a 50°C ($T_{\text{baño de agua}}$) hasta que se alcanzaba una concentración de 8 g
20 de β -caroteno/l.

Los cristales de β -caroteno se recuperaron del concentrado por medio de cristalización controlada y filtración posterior.

25 Se realizó el mismo experimento con biomasa que se combinaba y se secaba, y así no se extruía (Ejemplo 18). La capacidad de filtración después de la extracción de la biomasa secada combinada era peor en comparación con productos extruidos secados.

Ejemplo 19 y ejemplo comparativo 20

Aislamiento de TAPS de producto extruido secado de la levadura Pichia

30 Se recogió biomasa de 2 l de un caldo de fermentación no pasteurizado de la levadura *Pichia ciferrii* mediante centrifugación a 5000 rpm durante 10 minutos. La torta filtrante en fase sólida se lavó con una solución salina que contenía 5% de NaCl. La biomasa recuperada de ese modo con 33% de materia seca se deshidrató mecánicamente a
35 escala de laboratorio usando una prensa para frutas típica (HAFICO, D.G.M.). Durante un minuto, la torta se deshidrató a 200 kg/cm^2 .

40 El contenido de materia seca se había incrementado hasta 47%. La torta deshidratada se extruyó (Ejemplo 19) por medio de una extrusora de laboratorio de un solo tornillo usando un tornillo universal y un tambor perfilado. El diámetro del agujero en la hilera era 2 mm.

45 El producto extruido resultante se secó bajo vacío durante 40 horas a 40°C , dando como resultado un contenido de materia seca de aproximadamente 92%. Se extrajeron 25 gramos del producto extruido secado durante 6,5 horas a 50°C con acetato de etilo (relación biomasa/disolvente de 1:5 (p/v)).

El extracto recuperado de este modo se evaporó a 50°C bajo vacío (250 mbar), dando como resultado un aceite de TAPS (aproximadamente 60% de tetraacetilfitoesfingosina/l de aceite).

50 Ejemplo Comparativo 20

Secado por pulverización de Pichia ciferrii que contiene TAPS

55 Se secó por pulverización aproximadamente 1 kg de caldo de *Pichia ciferrii* en un secador de pulverización de laboratorio Büchi 190 a una temperatura del aire de 180°C (temperatura de entrada) y 110°C (temperatura de salida). Durante la alimentación del secador de pulverización el caldo se agitaba continuamente. El caldo se alimentó al secador a 1,2 l/h. La concentración de TAPS de la cantidad inicial de TAPS se analizó con el producto secado por pulverización. En el producto secado por pulverización sólo se recuperaba 13% de TAPS. Debido a las altas temperaturas la TAPS se degradaba. Así, este procedimiento no es una opción para el aislamiento de TAPS debido a la alta temperatura del
60 procedimiento.

Ejemplo 21

Recuperación de aceite de DHA de Cryptocodinium

65 Se recogió biomasa de 7 l de un caldo de fermentación (previamente pasteurizado, 65°C durante 1 hora) del alga *Cryptocodinium cohnii* usando una centrífuga a escala de laboratorio del tipo BECKMANN JM/6E. El caldo se centrifugó en porciones de 800 ml durante 2 minutos a 5000 rpm dando como resultado un sobrenadante transparente.

ES 2 205 202 T3

En total, se recuperaron 224 g de biomasa con un contenido de materia seca de 13%. Esto significa una concentración de biomasa en la recogida del caldo de fermentación de aproximadamente 4 g/kg. Se añadieron a esta biomasa recuperada 300 g de almidón (ROQUETTE, partida N° 10EV0024) para incrementar el contenido de materia seca. La torta recuperada de este modo se extruyó por medio de una extrusora de laboratorio de un solo tornillo usando un tornillo universal y un tambor perfilado. El diámetro del agujero en la hilera era 2 mm y el grosor de la hilera era 6 mm, dando como resultado una L/D de la hilera de 3. El producto extruido liso resultante se secó bajo vacío durante la noche a 50°C, dando como resultado un producto extruido secado agrietado. El contenido de materia seca de la biomasa secada de este modo era aproximadamente 94%.

Una muestra de aproximadamente 180 g del producto extruido secado se extrajo con hexano (relación de volumen inicial/biomasa de 5 l/kg). Después de 3 horas de extracción a 60°C, las micelas se filtraron sobre un filtro Whatman. La biomasa extraída resultante se lavó una vez con 1000 ml de hexano reciente. Las micelas filtradas recuperadas de este modo se expusieron a 68°C (T_{baño de agua}). De este modo, se recuperó un aceite que contenía DHA en bruto. La concentración de DHA en el aceite era 32,6%, analizada por medio de GC. El aceite recuperado de este modo contenía aproximadamente 67% de triglicéridos, 12% de diglicéridos, 3,7% de esteroides y aproximadamente 0,2% de antiespumante (NMR). Otra característica del aceite era el nivel de carotenoides (0,15 mg/ml de β -caroteno y 5 mg/ml de γ -caroteno).

Ejemplo 22

Recuperación de vitamina B12 de especies de Propionibacterium

Se recogió caldo de una fermentación a gran escala de una especie de *Propionibacterium* (28 toneladas) por medio de un clasificador del tipo BRPX-213-SGV (ALFA LAVAL, 3-7 toneladas/h) con un factor G de aproximadamente 5000. El caldo clarificado de este modo se concentró 2,5 veces por medio de ultrafiltración usando un módulo ABCOR KOCH con aproximadamente 150 m² de membranas de polietilensulfona arrolladas en espiral con un corte de 5 kD (tipo HFK 131-VSV). El ultrafiltrado resultante se diafiltró para 500% de acuerdo con el volumen concentrado con agua de procesamiento. El diafiltrado resultante se concentró en un factor de 3 por medio de evaporación a vacío y el concentrado resultante se sometió a choque térmico a 90°C durante 2 minutos.

El concentrado resultante se granuló y se secó en un secador de múltiples fases NIRO 250 (secador de pulverización/aglomerador de lecho fluidizado). La temperatura del aire de entrada del secador era aproximadamente 250°C y la temperatura del aire de salida era aproximadamente 70°C. El flujo de aire aplicado era aproximadamente 3000 m³/h. Esto daba como resultado una temperatura del producto de aproximadamente 70-80°C. La densidad del concentrado alimentado al secador era aproximadamente 1050 kg/m³.

Una muestra de aproximadamente 2 g de granulado secado se usó para extracción con 125 ml de aproximadamente 75% de etanol (el contenido de agua da un comportamiento de extracción/técnico óptimo) en un matraz cónico por medio de agitación durante 60 minutos a temperatura ambiente (extracto transparente). Después de la extracción la biomasa extraída se filtró usando un filtro de papel Whatman (filtración fácil). El filtrado rosa transparente recuperado de este modo se analizó con respecto a la vitamina B12. La biomasa resultante se lavó con 25 ml de etanol aproximadamente al 75%. De este modo, se extrajo aproximadamente 90% de la vitamina B12 de la biomasa granulada (Tabla 4).

TABLA 4

Datos relativos a la extracción de vitamina B12 de Propionic bacterium aglomerada en múltiples fases

muestra número		g	ml	densidad en kg/m ³	[vitamina B12] en mg/kg	vitamina B12 total en mg
VTB 9606 ^E /001	granulado de entrada	2,01	---	---	842	1,69
VTB 9606 ^K /002	extracción de salida	1,46	---	---	104,5	0,15
VTB 9606 ^K /003	extracto	---	110	856	11,7	1,10
VTB 9606 ^X /004	lavado	---	24	856	6,01	0,12

ES 2 205 202 T3

Ejemplo 23

Co-extrusión de C. cohnii y M. alpina

5 Se mezclaron entre sí 10 l de un caldo de fermentación del hongo *Mortierella alpina* y 10 l de un caldo de fermentación de *Cryptocodinium cohnii*. Para mejorar la capacidad de filtración del caldo mixto, se añadió CaCl_2 (concentración final de 5 g/l). El caldo mixto se filtró y la torta resultante se deshidrató mecánicamente usando una prensa para frutas típica (prensa para cítricos, HAFICO).

10 La torta recuperada de este modo se extruyó por medio de una extrusora de laboratorio de un solo tornillo usando un tornillo transportador universal en un tambor perfilado y una hilera con un agujero de 2 mm. El diámetro del producto extruido era aproximadamente 2 mm. El producto extruido recuperado de este modo se secó en un secador de lecho fluido a escala de laboratorio ($T_{\text{aire}} = 40^\circ\text{C}$, tiempo de secado de aproximadamente una hora, flujo de aire de $150 \text{ Nm}^3/\text{h}$, AEROMATIC MP-1). El contenido de materia seca de la biomasa secada de este modo era aproximadamente 92°C .

15 Se usó una muestra de aproximadamente 100 g de producto extruido secado para la extracción con hexano (relación de volumen inicial/biomasa de 4 l/kg). Después de 2 horas de extracción a temperatura ambiente, las micelas se recuperaron por medio de filtración a vacío. El producto extruido extraído restante se lavó con 4 volúmenes de hexano reciente (relación de volumen inicial/biomasa de 4 l/kg). El hexano lavado se mezcló con las micelas y las micelas resultantes se evaporaron a 50°C ($T_{\text{baño de agua}}$). De este modo, se recuperó un aceite de PUFA en bruto que contenía

20 ARA (C20:4 ω 6) y DHA (C22:6 ω 3).

El aceite en bruto puede refinarse de acuerdo con métodos habituales para aceites comestibles/vegetales.

25 Ejemplo 24

Recuperación de lovastatina en bruto de Aspergillus terreus

El pH de 7,5 l de un caldo de fermentación (no pasteurizado) del hongo *Aspergillus terreus*, que contenía 2 g de lovastatina por kg de caldo, se ajustó hasta pH 2,1 con ácido sulfúrico para precipitar la lovastatina y se agitó a este pH durante 15 minutos. Posteriormente, el caldo se filtró y el filtrado, que contenía sólo 3,5% de la cantidad total de lovastatina presente en el caldo, se descartó.

35 La torta filtrante mojada (230 gramos, 18,5% de materia seca) se deshidrató mecánicamente hasta un contenido de materia seca de 45% usando una prensa para frutas típica (prensa para cítricos, HAFICO) y posteriormente se extruyó por medio de una jeringa de acero inoxidable equipada con una hilera que contenía cuatro agujeros de 1,8 mm cada uno. Los productos extruidos resultantes se secaron durante la noche a 40°C en un horno de vacío hasta un contenido de materia seca de aproximadamente 95%. Se extrajeron 10 g de los productos extruidos secados con 1 l de una mezcla de tolueno (0,85 l) y acetona (0,15 l) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después de la separación

40 de los productos extruidos mediante filtración, se obtuvo un extracto que contenía lovastatina con un contenido de lovastatina de 1,5 g/l.

Ejemplo 25

45 *Recuperación de ergosterol de FERMIPAN comercial*

FERMIPAN es una levadura secada disponible comercialmente producida por *Gist brocades*. Una muestra de FERMIPAN (partida N° 9510702) de aproximadamente 2 gramos se extrajo por medio de 100 ml de etanol al 70% durante 30 minutos a temperatura ambiente. El extracto transparente resultante se separó del FERMIPAN extraído por medio

50 de filtración. El filtrado transparente recuperado de este modo se analizó por medio de NMR. En aproximadamente 22 g del extracto se encontraron 0,09 mg de ergosterol. Es importante en la extracción de ergosterol el contenido de agua en el etanol. Esta concentración no se optimizaba. El experimento era un experimento indicativo para mostrar la extracción del compuesto valioso ergosterol a partir de levadura granulada (levadura secada extruida).

55 Ejemplo 25

Ventajas de la biomasa granulada/extruida

Se procesó biomasa de PUFA de acuerdo con la ruta descrita en el Ejemplo 1 (filtración, extrusión y secado).

60 La porosidad de la biomasa de PUFA extruida secada se midió en un porosímetro (Pharmitalia Carlo Erba, Italia) 2000 y una unidad macroporse 120 (Carlo Erba). Los resultados se presentan en la Tabla 5.

65 La distribución del volumen de poros se presenta en la Figura 5. La Figura 6, para comparación, da la distribución de volumen de poros de levadura secada (FERMIPAN, Gist-brocades).

ES 2 205 202 T3

La línea (con el eje Y a la izquierda) presenta el volumen de poros acumulativo y el histograma (con el eje Y a la derecha) es una distribución de volumen de poros diferencial relativa. Se muestra que la mayoría de los poros se encuentran en la región de un diámetro de poro de 10.000-100.000 nm.

5

TABLA 5

Resultados de la medida de la porosidad (dos veces) de la misma biomasa secada extruida de PUFA (método de porosidad de mercurio)

10

muestra	peso de muestra en g	volumen de muestra en cm ³	densidad de muestra en g/cm ³	volumen de poros total en cm ³ /g	porosidad en %
Biomasa I secada de PUFA	0,5008	0,555	0,90	0,304	27
Biomasa II secada de PUFA	0,8684	1,011	0,86	0,348	30

15

20

25

30

Se sometieron 81 g de biomasa de PUFA extruida secada a extracción en una columna por medio de hexano a temperatura ambiente (20°C) en una extracción por percolación de corriente cruzada para obtener el aceite de PUFA. Se drenaron trece volúmenes de lecho de hexano reciente (un volumen de lecho es la cantidad de hexano necesaria para atravesar todo el lecho) a través del lecho de biomasa. La cantidad de aceite en bruto en cada volumen de lecho de hexano drenado se determinó mediante el peso después de la evaporación del hexano.

35

Condiciones de extracción:

40

- el volumen intra-particular del lecho de biomasa era 80 ml (= 1 volumen de lecho)
- caudal de un volumen de lecho por 300 segundos
- se extrajo 50% de la cantidad total de aceite en 300 segundos en un volumen de lecho
- la densidad aparente de la biomasa secada era 570 kg/m³
- el diámetro de las partículas era 0,0025 m
- temperatura de extracción de 20°C
- la solubilidad de aceite en hexano es infinita
- el contenido de aceite de la biomasa 35,5 p/p (%).

45

50

55

El hexano se evaporó a escala de laboratorio en un rotavapor a 60°C (T_{bañodeagua}) bajo vacío para dar el PUFA. Las partículas de PUFA (productos extruidos secados) que se describen eran partículas no uniformes porosas que eran ideales para la extracción. Había una gran superficie específica disponible para el intercambio de aceite. Por lo tanto, la limitación por difusión para la extracción es baja.

60

Ejemplo comparativo 26

Las diversas condiciones de cultivo que se usaron para obtener la biomasa y los caldos descritos en los ejemplos previos se darán ahora en la siguiente tabla.

65

Microorganismo	Producto	Tipo de procedimiento	Nutrientes (g/l)	Temperatura (°C)	pH	Tiempo (horas)
<i>Pichia ciferrii</i> (= <i>Hansenula ciferrii</i>)	Tetraacetilfitoesfingosina (=TAPS) (extracelular)	partida alimentada (alimentación de glucosa)	glucosa: 30 extracto de levadura: 3 extracto de malta: 3 peptona: 5	25	6,5-6,8	96
<i>Mortierella alpina</i>	ácido araquidónico (intracelular)	partida	glucosa: 50 extracto de levadura: 5 NaNO ₃ : 5 K ₂ HPO ₄ : 3 MgSO ₄ ·7H ₂ O: 0,5 sales amónicas minerales	25	5,5-7	120-168
<i>Blakeslea trispora</i>	β-caroteno (intracelular)	partida	Pharmamedia: 75 glucosa: 10 KH ₂ PO ₄ : 0,5 MnSO ₄ ·H ₂ O: 0,1 aceite de soja: 30 aceite de semillas de algodón: 30 dextrans: 60 Triton X-100: 1,2 ácido ascórbico: 6 ácido láctico: 2 tiamina-HCl: 2 mg isoniazida: 0,075%	26-28	6,5	7 días

Microorganismo	Producto	Tipo de procedimiento	Nutrientes (g/l)	Temperatura (°C)	pH	Tiempo (horas)
<i>Aspergillus terreus</i>	Lovastatina	partida alimentada (glucosa + amoniaco)	glucosa: 20 extracto de levadura: 11,3 KH ₂ PO ₄ : 3,5 Na ₂ SO ₄ : 1,0 MgSO ₄ .7H ₂ O: 1,4 CaCl ₂ .2H ₂ O: PPG (2000) (antiespumante): 0,1 elementos traza	28	6,5	8 días
<i>Propionibacterium sp.</i>	Vitamina B ₁₂ (intracelular)	partida alimentada (anaerobia) (alimentación de glucosa + después de 4 días: 10 mg/l de 5,6-dimetilbenzimidazol)	glucosa: 10 líquido de maceración de almidón: 80 (NH ₄) ₂ SO ₄ : 16 KH ₂ PO ₄ : 0,4 Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O: 1,5 MgSO ₄ .7H ₂ O: 0,5 minerales pantotenato Ca: 10 mg	30	5-7,5	168
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	Acido docosaheptaenoico (=DHA) (intracelular)	partida alimentada (68 g/l de glucosa + 24 g/l de extracto de levadura)	Ocean [®] agua marina artificial: 250 (instantánea) extracto de levadura: 6 glucosa: 12	20-28	7-7,8	70-80

Referencias relativas a las técnicas de fermentación

Maister H.G., Rogovin S.P., Stodola F.H., Wickerham L.J., “Formation of Extracellular Sphingolipids by Microorganisms. IV. Pilot-Plant Production of Tetraacetylphytosphingosine by *Hansenula ciferrii*”.

5 *Appl. Microbiol.*, 10, 401-406. (1962) **Zu-Yi Li, Yingyin Lu, Yadwad V.B., Ward O.P.**, “Process for Production of Arachidonic Acid Concentrate by Strain of *Mortierella alpina*”.

10 *Can. J. Biochem. Eng.* 73, 135-139 (1995) **Finkelstein M., Huang C-C., Byng G.S., Tsau B-R., Leach J.**, “*Blakeslea trispora* mated culture capable of increased betacarotene production” US patent 5.422.247 (1995).

Kojima I., Kouji K., Sato H., Oguchi Y., “Process for the producing Vitamin B₁₂ by the fermentation technique, and Vitamin B₁₂-producing microorganism”. US patent 4.544.633 (1985).

15 **Kyle D.J., Reeb S.E., Sicotte V.J.**, “Production of decosahexaenoic acid by dinoflagellates”. US patent 5.407.957 (1995).

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 205 202 T3

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para el aislamiento de uno o más compuestos de una biomasa microbiana que comprende un microorganismo que ha producido tal compuesto, comprendiendo el procedimiento:
- proporcionar, u obtener, una biomasa con un contenido de materia seca de 25 a 80%;
 - extruir la biomasa en partículas granulares que tienen un contenido de materia seca medio de 25 a 80%;
 - secar las partículas granulares para dar gránulos secados que tienen un contenido de materia seca medio de al menos 80%; y
 - purificar, extraer o aislar el o cada compuesto de los gránulos secados resultantes de (c).
2. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la biomasa se somete a desmenuzamiento o amasado antes de la granulación.
3. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en el que la biomasa en (a) se obtiene mediante separación sólido/líquido realizada sobre un caldo de fermentación y opcionalmente la separación sólido/líquido se combina con deshidratación mecánica.
4. Un procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que en (a) la biomasa con un contenido de materia seca de 25 a 80% se obtiene mediante:
- la adición de un material sólido a la biomasa; o
 - deshidratación de la biomasa.
5. Un procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que el secado de la biomasa granulada en (c) hasta un contenido de materia seca de al menos 80% se realiza mediante secado en lecho fluidizado o lecho subfluidizado o secado a vacío.
6. Un procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que la biomasa comprende, o se origina a partir de, un hongo o un alga.
7. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el hongo pertenece al orden *Mucorales* y/o el alga es un dinoflagelado y/o pertenece al género *Cryptocodinium*.
8. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el hongo pertenece al género *Mortierella*, *Phycomyces*, *Blakeslea* o *Aspergillus*.
9. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 7, en el que el hongo es *Mortierella alpina* y/o el alga es *Cryptocodinium cohnii*.
10. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación precedente, en el que el compuesto es un ácido graso poliinsaturado (PUFA), opcionalmente contenido en un lípido.
11. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el ácido graso poliinsaturado es un ácido graso poliinsaturado ω -3 C18, C20 o C22 u ω -6 C18, C20 o C22.
12. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el compuesto es un ácido graso poliinsaturado ω -3 C20 o C22 u ω -6 C20 o C22.
13. Un procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que el compuesto es ácido araquidónico (ARA), ácido eicosapentaenoico (EPA) y/o ácido docosahexaenoico (DHA).
14. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el compuesto es un carotenoide o un inhibidor de HMG-CoA reductasa (por ejemplo, lovastatina, pravastatina o compactina).
15. Un procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que el microorganismo es una levadura y/o el compuesto es tetra-acetil-fito-esfingosina (TAPS).
16. Un procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que el microorganismo es una bacteria y/o el compuesto es una vitamina.
17. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación precedente, en el que la biomasa se obtiene a partir de un caldo de fermentación después de la acidificación (tal como hasta un pH <5).

ES 2 205 202 T3

18. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 17, en el que la acidificación (por ejemplo hasta un pH de aproximadamente 2) da como resultado la precipitación del compuesto.

19. Un producto extruido microbiano poroso que comprende, o se obtiene a partir de, un hongo.

20. Un producto extruido de acuerdo con la reivindicación 19, en el que el hongo es del género *Mortierella*.

21. Una composición que comprende partículas granulares porosas de biomasa, teniendo las partículas un contenido de materia seca medio de al menos 30% pero menor que 70% y habiéndose obtenido al extruir biomasa.

22. Una composición que comprende gránulos secados porosos, derivándose los gránulos de una biomasa microbiana extruida y secada, y teniendo un contenido de materia seca medio de al menos 80%.

23. Una composición de acuerdo con la reivindicación 21 ó 22, en el que las partículas granulares o los gránulos secados se forman mediante extrusión y/o la biomasa comprende un hongo.

24. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 21 a 23, en la que las partículas granulares tienen un diámetro de 0,3 a 10 mm y su longitud es, de media, 2 a 6 veces la del diámetro del gránulo.

25. Un procedimiento para el aislamiento de uno o más compuestos de gránulos de biomasa, comprendiendo el procedimiento

a) proporcionar gránulos secados porosos que tienen un contenido de materia seca de al menos 80%, habiéndose derivado los gránulos de una biomasa microbiana extruida que comprende microorganismos que han producido tal compuesto; y

b) extraer o aislar el o cada compuesto de los gránulos secados mediante extracción con disolvente.

NOTA INFORMATIVA: Conforme a la reserva del art. 167.2 del Convenio de Patentes Europeas (CPE) y a la Disposición Transitoria del RD 2424/1986, de 10 de octubre, relativo a la aplicación del Convenio de Patente Europea, las patentes europeas que designen a España y solicitadas antes del 7-10-1992, no producirán ningún efecto en España en la medida en que confieran protección a productos químicos y farmacéuticos como tales.

Esta información no prejuzga que la patente esté o no incluida en la mencionada reserva.

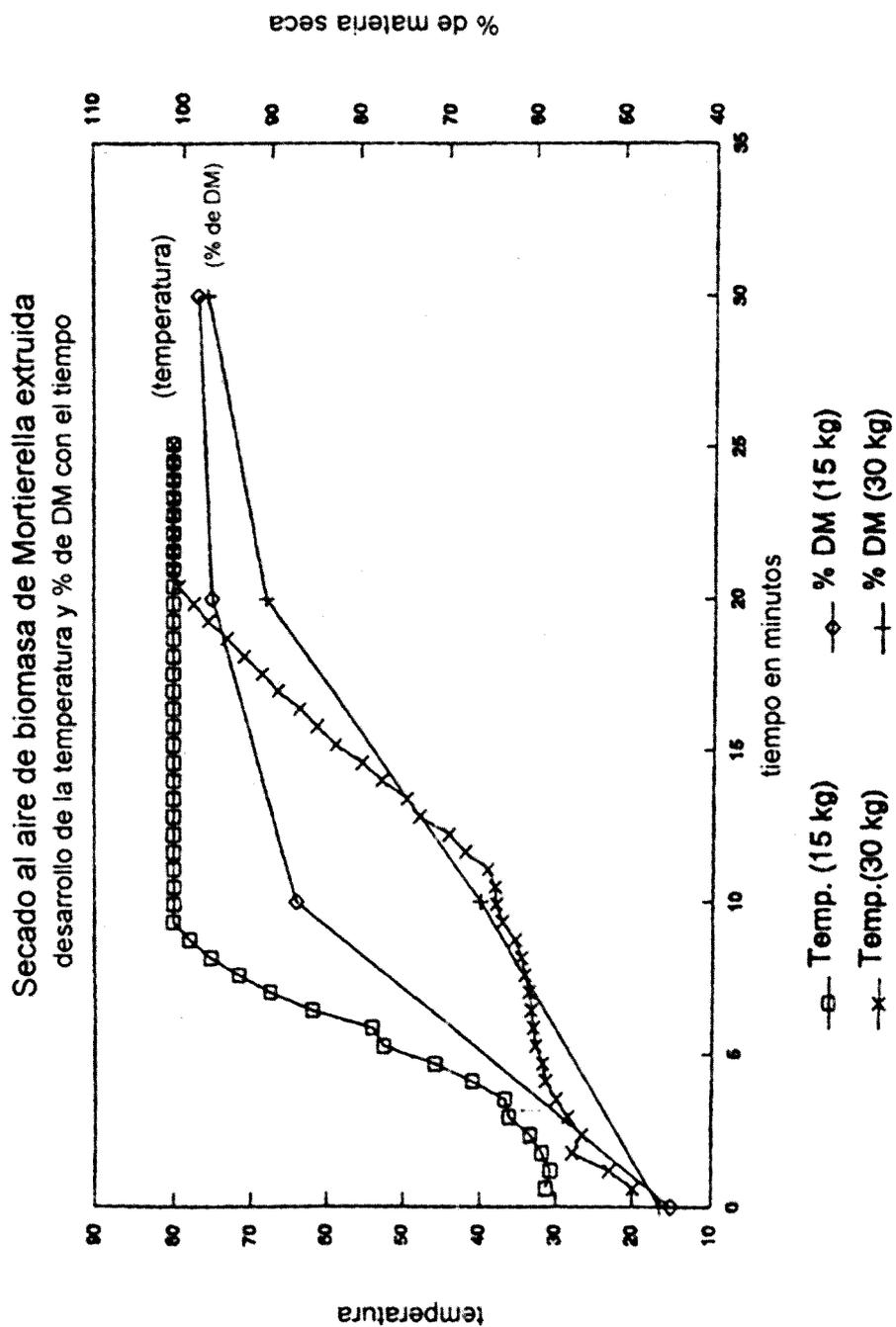


FIGURA 1

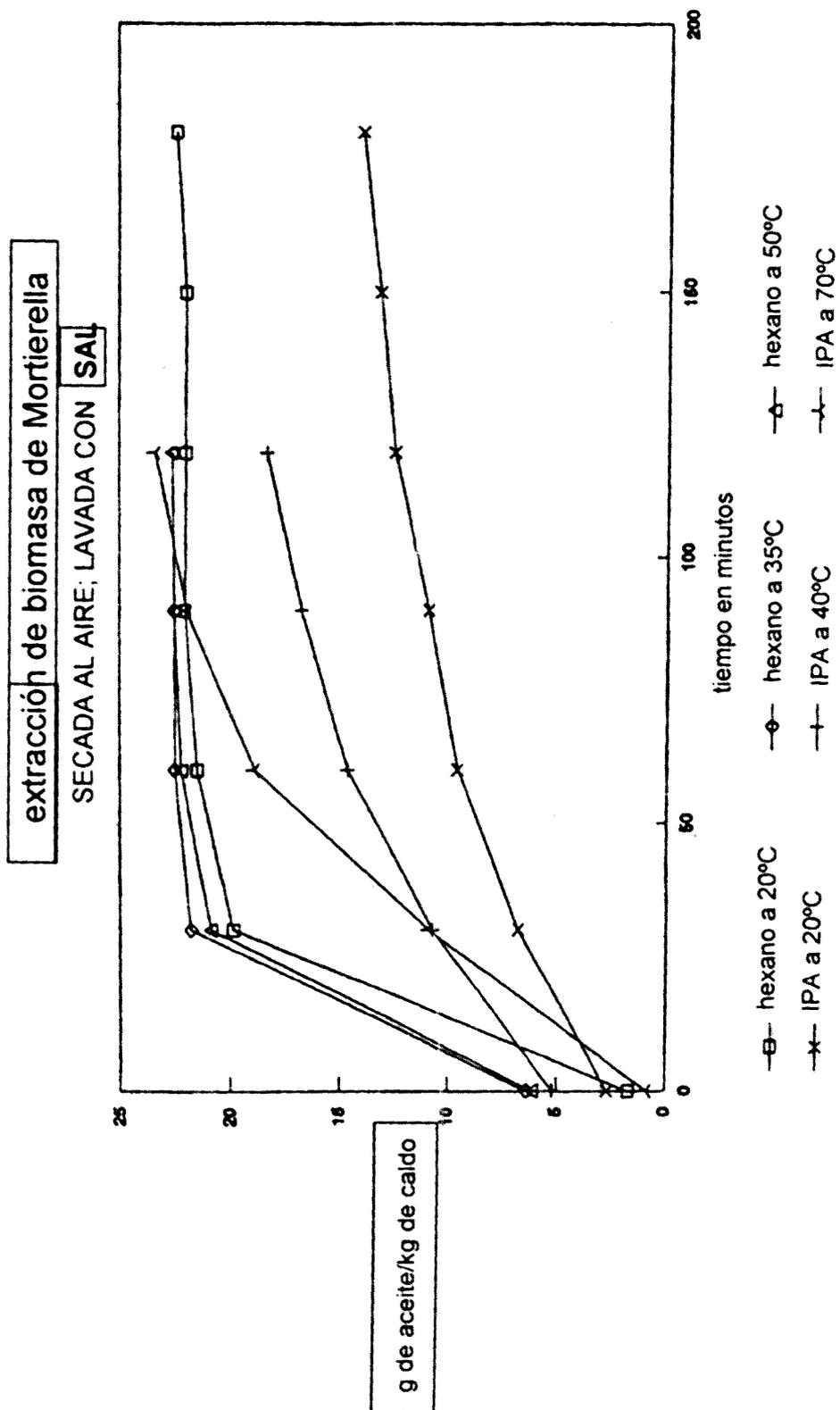


FIGURA 2

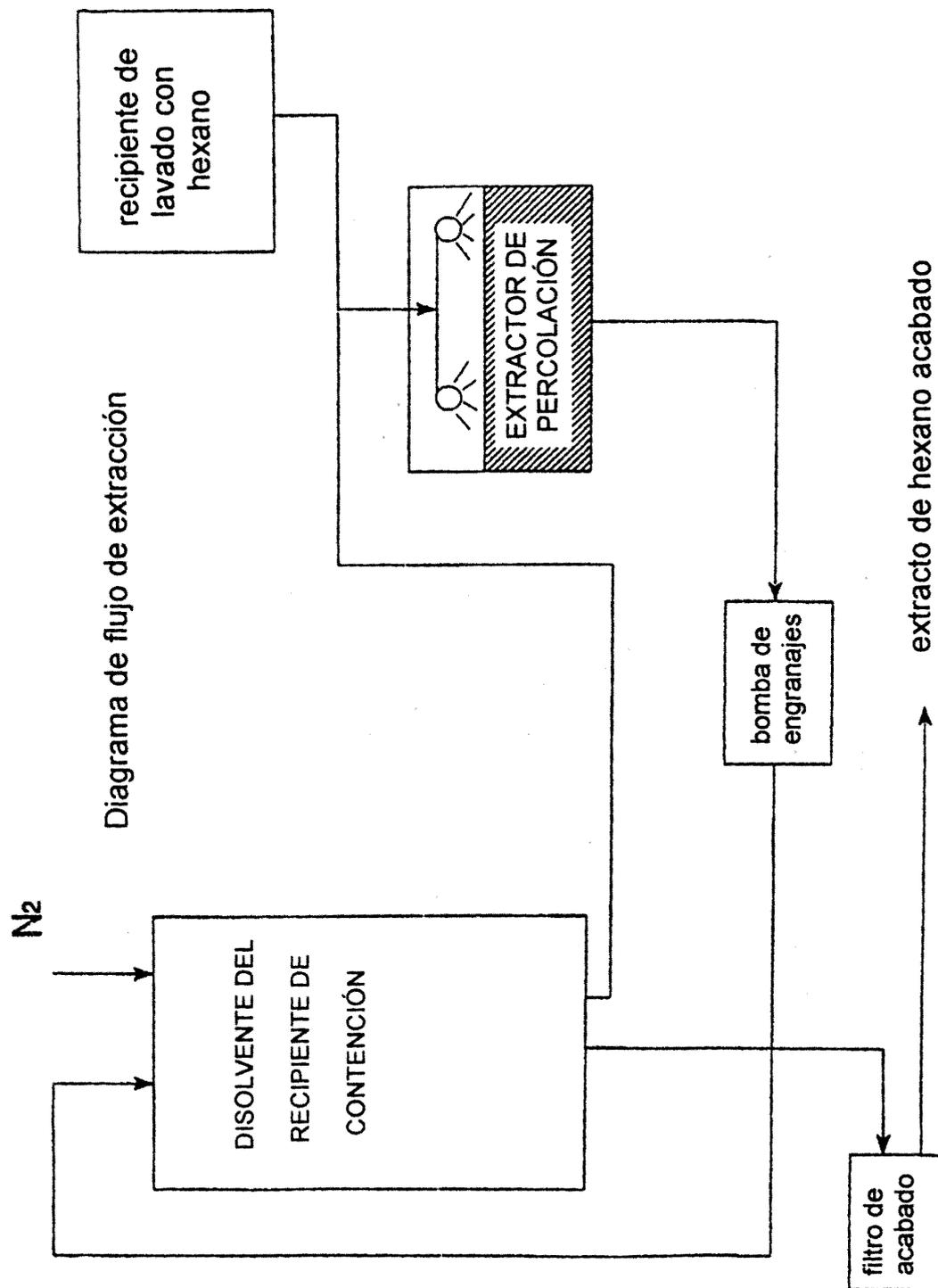


FIGURA 3

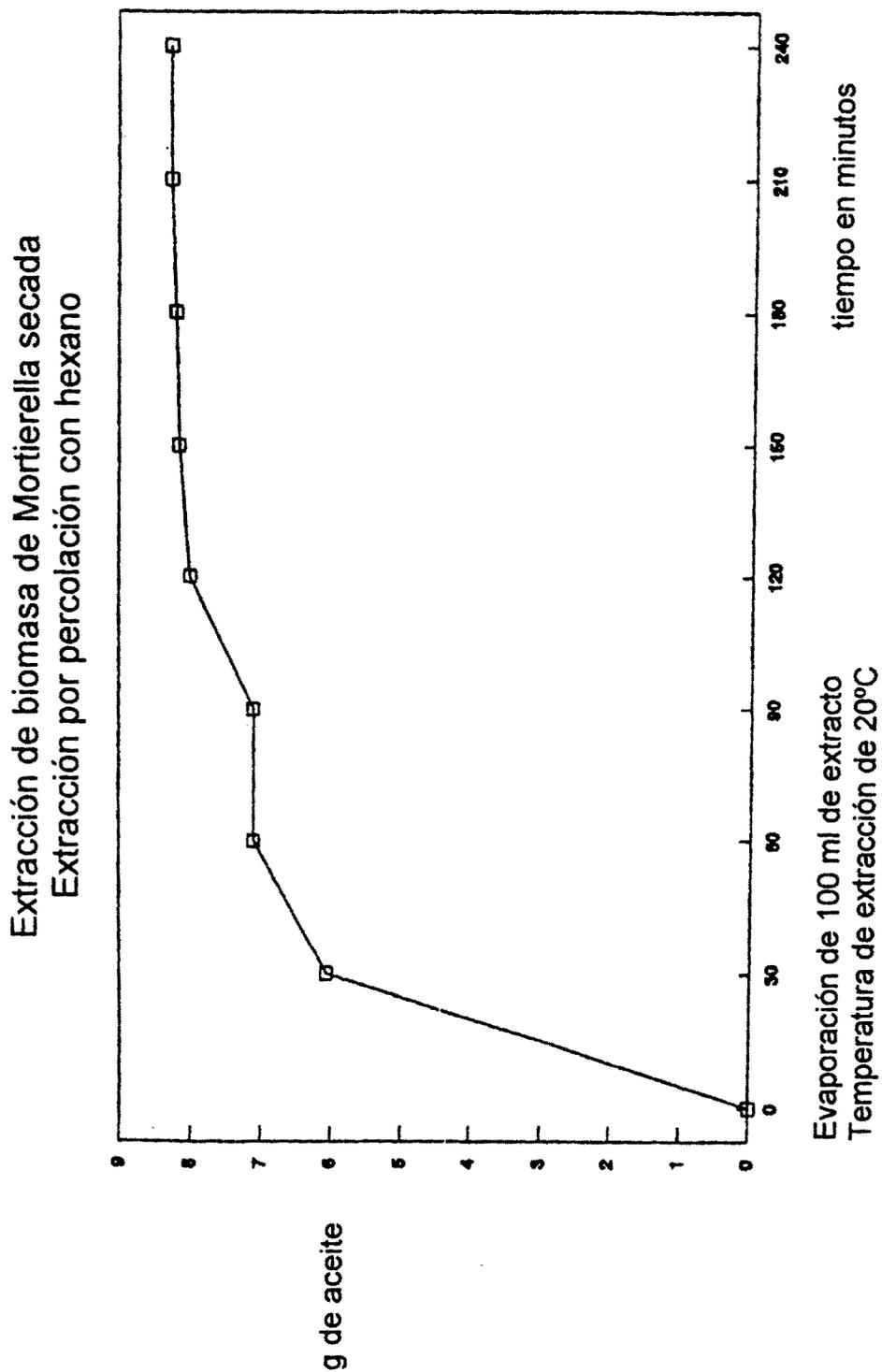


FIGURA 4

FIGURA 5

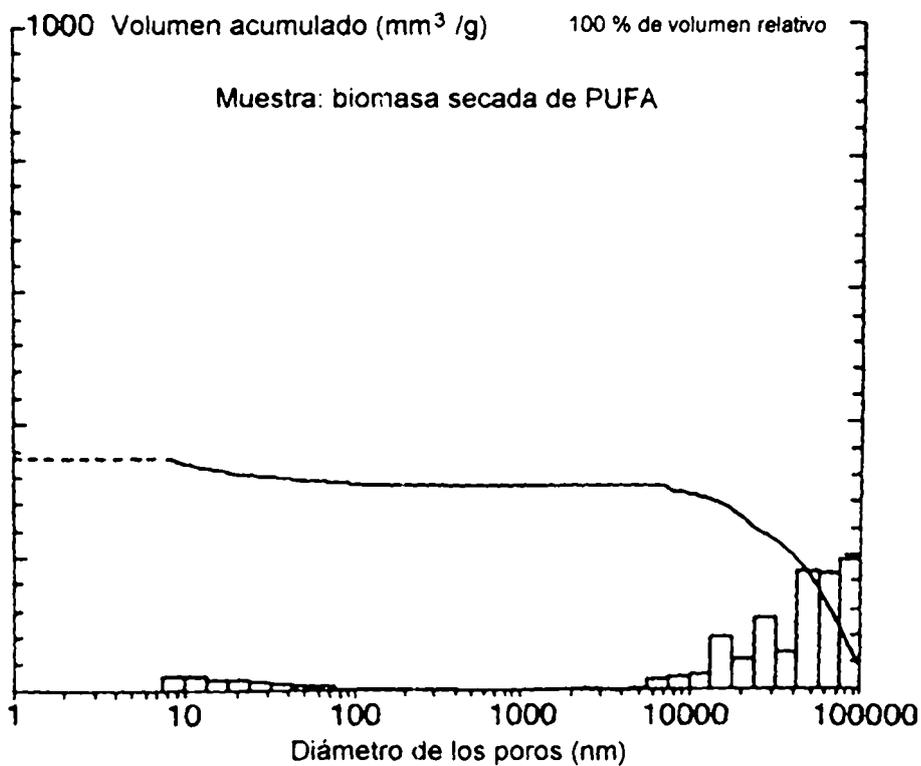


FIGURA 6

