

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 370 072**

51 Int. Cl.:
B01D 11/04 (2006.01)
B01D 11/02 (2006.01)
C12P 23/00 (2006.01)
C12P 1/00 (2006.01)
C12R 1/89 (2006.01)
C12M 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08736463 .4**
96 Fecha de presentación: **22.04.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2142270**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **13.01.2010**

54 Título: **PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN INTENSIVO DE PRODUCTOS CELULARES DE MICROORGANISMOS, MEDIANTE CULTIVO Y EXTRACCIÓN CONTINUOS, Y DISPOSITIVO CORRESPONDIENTE.**

30 Prioridad:
27.04.2007 FR 0703070

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
12.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
12.12.2011

73 Titular/es:
**UNIVERSITÉ DE NANTES
1, QUAI DE TOURVILLE B. P. 13522
44035 NANTES CEDEX , FR y
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE- CNRS**

72 Inventor/es:
**PRUVOST, Jérémy;
LEGRAND, Jack y
FOUCAULT, Alain**

74 Agente: **de Elizaburu Márquez, Alberto**

ES 2 370 072 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 de extracción intensivo de productos celulares de microorganismos, mediante cultivo y extracción continuos, y dispositivo correspondiente.

El campo de la invención es el de los procedimientos de extracción de compuestos celulares.

5 Se pueden contemplar diferentes aplicaciones de la invención, y especialmente la extracción de:

- moléculas bioactivas (pigmentos, vitaminas...), para los sectores de la farmacia, la cosmética y el sector agro-alimentario;
- moléculas con alto poder energético (lípidos) para el campo de la energía.

10 De forma más precisa, la invención se refiere a un procedimiento y a un dispositivo de extracción intensivo y biocompatible de compuestos intracelulares derivados de microorganismos fotosintéticos.

Uno de los intereses de los microorganismos fotosintéticos tales como las microalgas y las cianobacterias reside en su composición original.

15 La mayor parte de estos compuestos incluyen sin embargo, aplicar condiciones de estrés al cultivo con el fin de actuar sobre la flexibilidad metabólica importante de este tipo de microorganismos para llevar a cabo la biosíntesis del compuesto deseado.

Cuando este compuesto es intracelular (como los pigmentos principalmente), es necesario realizar una segunda etapa de extracción que en la mayor parte de los casos, provoca daños irreversibles en el cultivo (rotura por choque término u osmótico, desintegración celular...).

20 Las producciones industriales basadas sobre este principio han recurrido por tanto a producciones discontinuas, alternando sucesivamente fases de producción de biomasa, de puesta en condiciones de estrés, y después fases de recogida, extracción y purificación.

25 El mayor inconveniente de las producciones discontinuas está ligado a la débil velocidad de crecimiento de los microorganismos fotosintéticos (en comparación con los microorganismos heterótrofos tales como las bacterias o las levaduras), que impide las recogidas frecuentes, o por lo menos impone trabajar con varios sistemas de producción en paralelo.

Para ciertos compuestos, es posible utilizar una técnica de extracción original, en la que solo se extrae el compuesto, sin alteración importante de la célula (extracción biocompatible). Esto permite producir de forma continua el compuesto, evitando completamente la repetición de la fase de crecimiento y de estrés.

30 En efecto, si esta técnica se asocia a una producción en continuo de biomasa en un fotobiorreactor, una vez realizada la fase inicial de crecimiento, las condiciones de estrés aplicadas a continuación, se pueden mantener en teoría indefinidamente en la medida en que el compuesto producido entonces se extrae de forma continua.

Se produce una ganancia de productividad no despreciable con respecto a los procedimientos discontinuos, siendo evitadas las pérdidas ligadas al tiempo de latencia necesario antes de obtener de nuevo una biomasa que presenta la composición celular deseada.

35 Una técnica de este tipo de producción-extracción continua ha sido propuesta por Hejazi et Wijffels en 2003 (documento de patente publicada con el número EP-1.501.937) y se describe con referencia a la figura 1.

Este dispositivo se basa igualmente en los trabajos que han puesto en evidencia la existencia de disolventes biocompatibles que permiten la extracción de compuestos recuperables, en el caso del β -caroteno derivado de la microalga *Dunaliella salina* (trabajos de Leon *et al.* 2003).

40 Tal como se ilustra en la figura 1, este dispositivo comprende un fotobiorreactor en el que coexisten el cultivo 1 que contiene el compuesto a extraer y el disolvente 2 en el que se extrae progresivamente este compuesto (sistema bifásico).

45 Aunque operacional, este procedimiento presenta diferentes limitaciones. En efecto, la velocidad de extracción es relativamente débil, debido al hecho de la dificultad de poner en contacto las dos fases no miscibles (cultivos en medio acuoso, y disolvente hidrófobo). Siendo débil la interfase de contacto, se produce una importante limitación de transferencia de materia. La solución consiste en mezclar muy fuertemente el conjunto, lo que alcanza sin embargo rápidamente un límite dado por la fragilidad de las células cultivadas.

50 Otro inconveniente reside en la imposibilidad de imponer condiciones óptimas, siendo diferentes los dos procesos (biosíntesis y extracción). A título de ejemplo, al ser fotosensible el β -caroteno extraído, la utilización de una fuerte iluminación (condición de estrés necesaria para la biosíntesis) para el cultivo impone trasegar regularmente el disolvente cargado de pigmento antes de la degradación.

La patente ES5110319 divulga un procedimiento de extracción de etanol a partir de mostos de fermentación utilizando un disolvente biocompatible, en el que el mosto de fermentación se extrae en una columna de extracción contra-corriente con el disolvente de extracción. El mosto extraído se recicla entonces hacia el fermentador.

La invención tiene especialmente por objetivo paliar los inconvenientes de la técnica anterior.

- 5 Más precisamente, la invención tiene por objetivo proponer una técnica de producción-extracción continua de compuestos celulares derivados de microorganismos que permiten considerar un aumento de las velocidades de producción y de extracción con respecto a los métodos de la técnica anterior.

10 La invención tiene también por objetivo proporcionar una técnica de tal tipo que incluya la aplicación de condiciones operativas particulares adaptadas a los compuestos extraídos, o para proteger las propiedades después de la extracción, o para mejorar la pureza de los compuestos extraídos, mediante la elección de disolvente selectivo y el control del tiempo de extracción.

15 Otro objetivo de la invención es proporcionar una técnica de tal tipo que permita la extracción tanto de compuestos intracelulares como de compuestos extracelulares. Estos objetivos, así como otros que aparecerán a continuación, se alcanzan gracias a la invención que tiene por objeto un procedimiento de extracción de compuestos celulares derivados de microorganismos, del tipo que comprende:

- una etapa de cultivo de dichos microorganismos;
- una etapa de extracción de dichos compuestos celulares derivados de dichos microorganismos,

20 caracterizado porque cada etapa se realiza en continuo, siendo realizada dicha etapa de extracción de forma separada de dicha etapa de cultivo, siendo realizada dicha etapa de extracción por cromatografía de reparto centrífugo y en condiciones de biocompatibilidad con dichos microorganismos con ayuda de un disolvente fuertemente apolar, tal como el decano o el dodecano, y siendo seguida de:

- al menos una etapa de recuperación de dichos compuestos celulares;
- al menos una etapa de recirculación de dichos microorganismos en dicha etapa de cultivo.

25 En la medida en que el procedimiento reposa sobre dos etapas distintas y continuas de cultivo y de extracción de compuestos celulares, la invención se aplica tanto a los microorganismos fotosintéticos como a los microorganismos no fotosintéticos (bacterias, levaduras). Sólo la etapa de cultivo difiere, pudiendo ser reemplazado el fotobiorreactor (en el caso de microorganismos fotosintéticos) por cualquier otro biorreactor adecuado para el microorganismo utilizado.

30 Como cada una de las fases (producción mediante cultivo y extracción) se basa en principios, tecnologías y parámetros muy diferentes, el funcionamiento en dos sub-sistemas según la invención permite tener un procedimiento global intensificado con posibilidad de control separado e independiente de cada sub-sistema.

35 Se debe observar que la invención se aplica de forma privilegiada a la extracción de un compuesto intracelular. Sin embargo, en ciertos casos, es posible que los microorganismos liberen en el medio un metabolito (metabolito extracelular). La invención se aplica igualmente a este caso, con el mismo principio global de funcionamiento, siendo la única diferencia que el metabolito se extrae entonces del medio de cultivo por el extractor (extracción líquido-líquido), en lugar de ser extraído directamente de la célula (extracción sólido-líquido).

Tanto si el metabolito es intra o extra-celular, el concepto de funcionamiento en bucle de los dos sub-sistemas no es posible sin embargo, más que si la fase de extracción no es destructiva frente al material biológico, a fin de que las células vivas sean reinyectadas en el sub-sistema de producción.

40 Si este no es el caso, los dos sub-sistemas funcionan en cascada, lo que es un esquema clásico a nivel industrial. La etapa de extracción debe evitar por tanto los daños irreversibles en el cultivo, ya sean mecánicos, térmicos o químicos. Una elección adecuada del sistema de extracción permite evitar los daños mecánicos y los choques térmicos.

45 La originalidad de la invención es por tanto la división en dos sub-sistemas optimizados, que funcionan de forma acoplada, respondiendo cada uno a las tensiones que permiten finalmente la producción-extracción continua. Con respecto al sistema existente, se aportan dos mejoras principales:

- la posibilidad de crecimiento de las transferencias de materia a nivel del extractor (y por lo tanto mejor rendimiento global);
 - la posibilidad de aplicar condiciones de extracción diferentes de las de producción para preservar la integridad del compuesto intracelular extraído.
- 50

En resumen, la invención permite mejoras importantes tanto en lo que concierne a la transferencia de materia, como en lo que concierne a la posibilidad propuesta de aplicar condiciones óptimas operativas para las dos etapas (producción y extracción), esto por la utilización de dos sub-sistemas dedicados a cada etapa y que funcionan de

forma acoplada, a saber con una producción en continuo y en condiciones de estrés del compuesto intracelular, y una parte de la extracción biocompatible de este compuesto.

5 Se observa que, incluso si a priori la complejidad del procedimiento ha aumentado por la utilización de los dos subsistemas, el acoplamiento se facilita por el funcionamiento en régimen continuo y permanente. Es posible así optimizar las condiciones de cultivo para mejorar la extracción (el mantenimiento de una concentración intracelular constante en el tiempo permite definir mejor las condiciones de extracción a aplicar).

Según una solución ventajosa, la etapa de cultivo mencionada es una etapa de bioproducción, que aporta al medio vivo las condiciones necesarias para la síntesis del metabolito buscado.

10 De forma ventajosa, la etapa de extracción mencionada es una etapa de extracción líquido-líquido (metabolito extracelular) o sólido-líquido (metabolito intracelular).

Un modo tal de extracción permite asegurar la transferencia del metabolito buscado de la célula (caso de un compuesto intracelular) y/o del medio de cultivo (caso de un compuesto extracelular secretado) a un disolvente recuperado a continuación a la salida del extractor.

La etapa de extracción se realiza por cromatografía de reparto centrífugo (CPC).

15 Así las fuertes capacidades de transferencia de la CPC permiten disponer de un sistema de extracción líquido-líquido de alta resolución.

20 La utilización de la CPC implica sin embargo una tensión importante, a saber la posibilidad de fuertes tensiones mecánicas sufridas por las células vivas después de haber atravesado el aparato (campo centrífugo, sistema de bombeo del cultivo, cizallamiento entre y en cada célula de separación). El sistema no es por tanto utilizable en continuo más que si el cultivo es capaz de soportar este tratamiento. Los ensayos han demostrado la posibilidad de aproximación y su potencial (mejores rendimientos con respecto a los publicados), con la condición sin embargo de permanecer en una gama operativa de la CPC aceptable para preservar la integridad celular del material biológico.

Según una variante a considerar, la etapa de extracción mencionada se realiza en la oscuridad.

Según otra variante a considerar, la etapa de extracción mencionada se realiza en anoxia bajo nitrógeno gaseoso.

25 Se comprende por tanto que un procedimiento según la invención permite aplicar fácilmente condiciones particulares en el sistema de extracción, como el trabajo en la oscuridad si el producto es fotosensible, o en condiciones de anoxia, si el producto se oxida fácilmente. Igualmente, el modo de extracción aceptado se puede elegir para que ocasione una gran selectividad (elección del disolvente y control del tiempo de extracción).

30 La invención se refiere igualmente a un dispositivo para la realización de un procedimiento tal como el descrito precedentemente, que comprende:

- al menos un tanque de cultivo de dichos microorganismos;
- al menos un tanque de extracción por cromatografía de reparto centrífugo de dichos compuestos celulares derivados de dichos microorganismos siendo dicho tanque de extracción distinto de dicho tanque de cultivo y conteniendo al menos un disolvente fuertemente apolar, tal como el decano o el dodecano, biocompatible con dichos microorganismos;
- 35 - medios de recuperación de dichos compuestos celulares;
- medios de recirculación de dichos microorganismos desde dicho tanque de extracción a dicho tanque de cultivo.

40 Se observa que la invención evita en los microorganismos los daños de origen químico, mediante la utilización de un disolvente biocompatible, que extrae el metabolito intracelular, sin alteración irreversible del metabolismo del microorganismo que puede llevar a la muerte celular.

Según una solución ventajosa, dicho tanque de cultivo es un fotobiorreactor y dicho tanque de extracción es un tanque de extracción líquido-líquido.

45 Otras características y ventajas de la invención aparecerán más claramente con la lectura de la siguiente descripción de un modo de realización preferente de la invención, dado a título de ejemplo ilustrativo y no limitativo, y los dibujos adjuntos entre los cuales:

- la figura 1 es una representación esquemática de un método de producción-extracción, nuevo según la técnica anterior;
- la figura 2 es una representación esquemática de un dispositivo para la realización de un procedimiento según la invención;
- 50 - la figura 3 es un gráfico que muestra los resultados de extracción por CPC del β -caroteno intracelular de un cultivo de *Dunaliella salina*, con ayuda de un procedimiento según la invención.

Tal como se ha indicado precedentemente, el principio de la invención reside en el hecho de proponer un procedimiento de producción-extracción de los compuestos celulares que se basa en la asociación de dos sub-sistemas que funcionan en bucle, estando cada uno dedicado específicamente a una de las dos fases de producción y de extracción.

5 Un dispositivo para la realización de un procedimiento según la invención, se describe en referencia a la figura 2.

Un dispositivo de este tipo comprende:

- un fotobiorreactor 3 que funciona en modo continuo, y que asegura la etapa de cultivo de los microorganismos fotosintéticos;
- un extractor 4 que asegura de forma continua la extracción de los compuestos celulares;
- 10 - medios de transferencia 5 de los microorganismos del fotobiorreactor al extractor 4;
- medios de recuperación 41 de los compuestos celulares;
- medios de recirculación 6 de los microorganismos del extractor 4 al fotobiorreactor 3.

15 La fase de biosíntesis se realiza así en uno o varios fotobiorreactores que funcionan en continuo, permitiendo aplicar condiciones ideales y controladas para llevar a una velocidad de biosíntesis optimizada del compuesto deseado. Modificando los parámetros físico-químicos de cultivo (temperatura, pH, medio de cultivo, luz incidente), es así posible favorecer por inducción de un estrés fisiológico la biosíntesis de un metabolito específico, interviniendo por ejemplo en la protección del microorganismo en este estrés (ejemplo del β -caroteno en situación de estrés luminoso y oxidativo).

20 El extractor está constituido por un tanque que contiene un disolvente biocompatible tal como el dodecano o el decano.

Con un disolvente de este tipo, se procede a una extracción biocompatible. Es posible entonces extraer en continuo y de forma selectiva ciertos compuestos intracelulares conservando siempre la vitalidad de las células.

25 En el caso de un disolvente débilmente hidrófilo, la puesta en contacto altera de forma irremediable la estructura celular. La extracción es entonces muy importante pero no selectiva (se extrae una gran cantidad de compuestos) y no biocompatible.

30 Por el contrario, si el disolvente se elige suficientemente apolar, es posible preservar la pared celular y las funciones vitales, manteniendo siempre una extracción de ciertos compuestos hidrófobos, y especialmente la clorofila y el β -caroteno en la *Dunaliella salina*. Cuanto más apolar es el disolvente, más disminuye la capacidad de extracción, con una reducción más marcada para la clorofila. Eligiendo un disolvente adecuado, se puede obtener por tanto una extracción biocompatible y selectiva del β -caroteno.

En comparación con los métodos duros de extracción convencionales pero casi completos de los pigmentos intracelulares, la pérdida de productividad generada por la utilización de un disolvente fuertemente apolar a priori menos eficaz puede ser compensada entonces por el mantenimiento de una extracción continua de β -caroteno directamente derivado de las células en cultivo.

35 Según el principio de la invención, el disolvente se mantiene en un sistema paralelo dedicado a la extracción (el extractor 4, claramente separado físicamente del fotobiorreactor 3) en el que transita el cultivo antes de volver al fotobiorreactor o los fotobiorreactores de producción.

40 Con un dispositivo de este tipo, y aplicando una percolación importante por ejemplo (la fase dispersa es el cultivo, y la fase continua el disolvente), se produce un aumento importante de las superficies interfaciales entre el medio biológico acuoso y el disolvente (fases no miscibles). Aunque esto genere tensiones mecánicas elevadas (estrés hidrodinámico), se compensa por un tiempo de pase corto en el sub-sistema de extracción, teniendo en cuenta la velocidad elevada de extracción.

45 La etapa de extracción se realiza por cromatografía de reparto centrífugo (CPC): comparable a la HPLC (cromatografía de líquidos de alta resolución), sin embargo esta técnica difiere por la ausencia de soporte sólido y su importante capacidad de tratamiento.

50 En la técnica CPC, la parte útil está constituida por un disco en rotación provisto de una serie de cubetas de separación. Gracias a un importante campo de fuerzas centrífugas, una de las fases, llamada estacionaria, se mantiene en el aparato. La otra fase (móvil) que circula con un caudal forzado percola entonces a nivel de cada cubeta en la fase estacionaria, con lo que hay una mejora significativa de la puesta en contacto de las dos fases líquidas. La eficacia depende entonces de las condiciones operativas (velocidad de rotación, caudal de la fase móvil), de las propiedades físicas de las dos fases y de la forma de cada cubeta de separación (Marchal 2001). Este método se aplica usualmente a purificaciones de moléculas derivadas de mezclas complejas: compuestos naturales activos, péptidos, ácidos grasos, fosfolípidos, antibióticos, extracción de aromas, fraccionamiento de productos del petróleo...

Siguiendo la aplicación aludida, se contemplará la utilización de fotobiorreactores de grandes volúmenes, de cubetas de cultivo, o de fotobiorreactores de volúmenes más pequeños pero intensificados. El extractor será un extractor intensificado CPC, en el cual se optimizan las transferencias de materia y la puesta en contacto del medio de cultivo con el disolvente extractor.

- 5 Para demostrar la posibilidad de acoplamiento CPC-fotobiorreactor, se han realizado ensayos y se han dedicado especialmente a evaluar la cantidad de β -caroteno extraído y las pérdidas celulares asociadas, esto en función de diversos parámetros operativos de la CPC, utilizando el dodecano y el decano como disolventes. Algunos ejemplos de los resultados se presentan en la figura 3.

Estos resultados ponen de relieve tres de las principales características del procedimiento, a saber:

- 10 - el papel primordial de la transferencia de materia durante la extracción;
 - la necesidad de encontrar un compromiso para respetar la integridad celular y;
 - la influencia de la solubilidad del β -caroteno en el disolvente.

15 El caudal de alimentación en fase móvil (cultivo) en la CPC desempeña así un papel importante. Una cantidad más elevada de β -caroteno se extrae con fuerte caudal, pero con una alteración considerable de las células vivas (pérdida de flagelos, mortalidad).

Debido al hecho de la capacidad del medio vivo a regenerarse, es sin embargo aceptable una pérdida pequeña de biomasa. Así, 48 horas después del pase en la CPC en condiciones severas, se recupera una gran parte del cultivo (pérdidas con respecto a la concentración inicial de 40 % a 20 %).

20 Esto demuestra la diversidad de los protocolos operativos posibles, ya sea con una extracción moderada pero permanente, o ya sea con una extracción importante pero secuencial, con tiempos de latencia a definir para regenerar el material vivo entre cada extracción.

Se observará que estas diferentes posibilidades de funcionamiento no lo modifican nada y se engloban en el principio global de la invención descrito previamente (funcionamiento en dos sub-sistemas).

25 Se recuerda que la separación de las dos etapas de producción y de extracción permite optimizar cada una de las fases (y su acoplamiento).

En lo que concierne a la parte de producción, es importante encontrar las condiciones que permiten maximizar la composición intracelular en β -caroteno. Estas condiciones se deben mantener en régimen continuo. Las condiciones de utilización de la CPC se puede optimizar entonces más fácilmente.

30 Debido al hecho de la ruptura aportada por el funcionamiento en dos sub-sistemas, se han realizado diferentes ensayos, con el fin de poner en práctica nuevos protocolos específicos.

En efecto, la mayor parte de los protocolos que existen han sido desarrollados sobre la base de un cultivo extensivo y discontinuo.

El funcionamiento en fotobiorreactor continuo aporta un nuevo punto de vista a optimizar.

Así, la concentración intracelular usualmente alrededor de 15-20 pg por células ha sido aumentada a 70.

35 Esto ha sido obtenido mediante forzamiento fisiológico actuando sobre las condiciones operativas clásicas de cultivo en un fotobiorreactor (temperatura, irradiación, pH) y modificando el medio de cultivo. Se han añadido así dos compuestos al medio de cultivo estándar, a saber el acetato y el hierro (Fe^{2+}), estos dos compuestos permiten favorecer a la vez el crecimiento y la biosíntesis del β -caroteno. Se debe observar que el funcionamiento en cultivo continuo permite optimizar fácilmente la cantidad respectiva de cada uno de los compuestos (cantidad por célula constante en el tiempo).

40 La asociación de la CPC a un fotobiorreactor rectangular sencillo de 4 litros y 3 cm de camino óptico que funciona en continuo y al que han sido aplicadas las condiciones que llevan a la biosíntesis de β -caroteno, ha permitido obtener los primeros resultados que confirman las diferentes mejoras aportadas por cada sub-sistema. Así, los estudios de la técnica anterior dirigidos sobre la extracción del β -caroteno en reactor sencillo han demostrado que se pueden
 45 extraer como máximo 5 a 10 mg/L.

La CPC ha permitido obtener una extracción de 148 mg/L de β -caroteno en cabeza de la columna, lo que es 30 veces más que los métodos utilizados según la técnica anterior (condiciones de extracción por CPC; caudal de alimentación 20 mL/min – velocidad de rotación 1000 tr/min – disolvente decano; condiciones de cultivo: fotobiorreactor rectangular de 4 litros – pH 7,5 – temperatura 30 °C – salinidad 220 g/L – luz incidente 700 $\mu\text{E}/\text{m}^2.\text{s}$).
 50 En total, se han extraído 1,25 mg de β -caroteno por 3200 mL de cultivo y 60 mL de disolvente.

En producción continua, se espera una productividad del orden de 50 mg de carotenoides por día y litro de cultivo.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de extracción de compuestos celulares derivados de microorganismos, del tipo que comprende:
- una etapa de cultivo de dichos microorganismos;
 - una etapa de extracción de dichos compuestos celulares derivados de dichos microorganismos,
- 5 caracterizado porque cada etapa se realiza en continuo, siendo realizada dicha etapa de extracción de forma separada de dicha etapa de cultivo, siendo realizada dicha etapa de extracción por cromatografía de reparto centrífugo y en condiciones de biocompatibilidad con dichos microorganismos con ayuda de un disolvente fuertemente apolar, tal como el decano o el dodecano, y siendo seguida de:
- al menos una etapa de recuperación de dichos compuestos celulares;
 - al menos una etapa de recirculación de dichos microorganismos en dicha etapa de cultivo.
- 10 2. El procedimiento de extracción según la reivindicación 1, caracterizado porque dicha etapa de cultivo es una etapa de producción biológica.
3. El procedimiento de extracción según una de las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado porque dicha etapa de extracción es una etapa de extracción líquido-líquido o sólido-líquido.
- 15 4. El procedimiento de extracción según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque dicha etapa de extracción se realiza en la oscuridad.
5. El procedimiento de extracción según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque dicha etapa de extracción se realiza en anoxia bajo nitrógeno gas.
- 20 6. Un dispositivo para la realización del procedimiento de extracción según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque comprende:
- al menos un tanque 3 de cultivo de dichos microorganismos;
 - al menos un tanque de extracción 4 por cromatografía de reparto centrífugo de dichos compuestos celulares derivados de dichos microorganismos, siendo dicho tanque de extracción 4 distinto de dicho tanque 3 de cultivo y conteniendo al menos un disolvente fuertemente apolar, tal como el decano o el dodecano, biocompatible con dichos microorganismos;
 - medios de recuperación 41 de dichos compuestos celulares;
 - medios de recirculación 6 de dichos microorganismos desde dicho tanque de extracción a dicho tanque de cultivo.
- 25 7. El dispositivo según la reivindicación 6, caracterizado porque dicho tanque 3 de cultivo es un biorreactor.
- 30 8. El dispositivo según las reivindicaciones 6 y 7, caracterizado porque dicho tanque de extracción 4 es un tanque de extracción líquido-líquido o sólido-líquido.

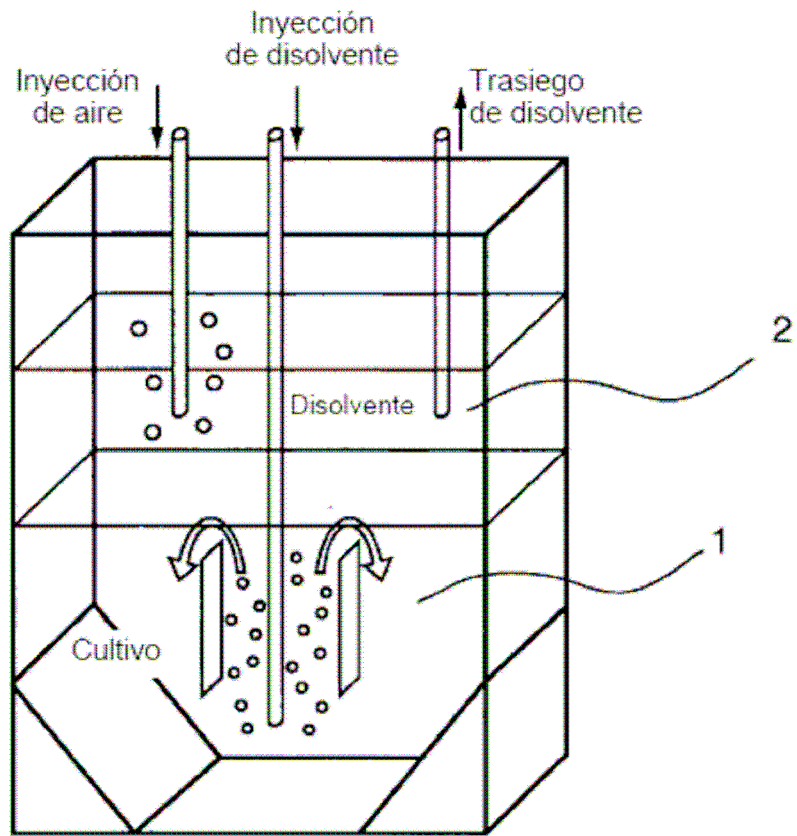


Fig. 1

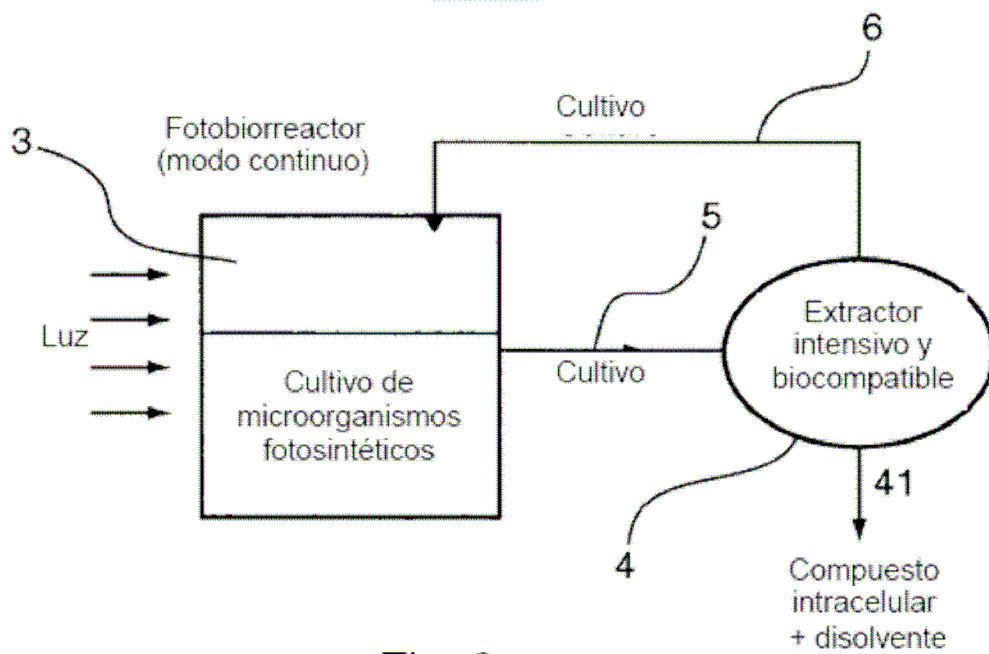


Fig. 2

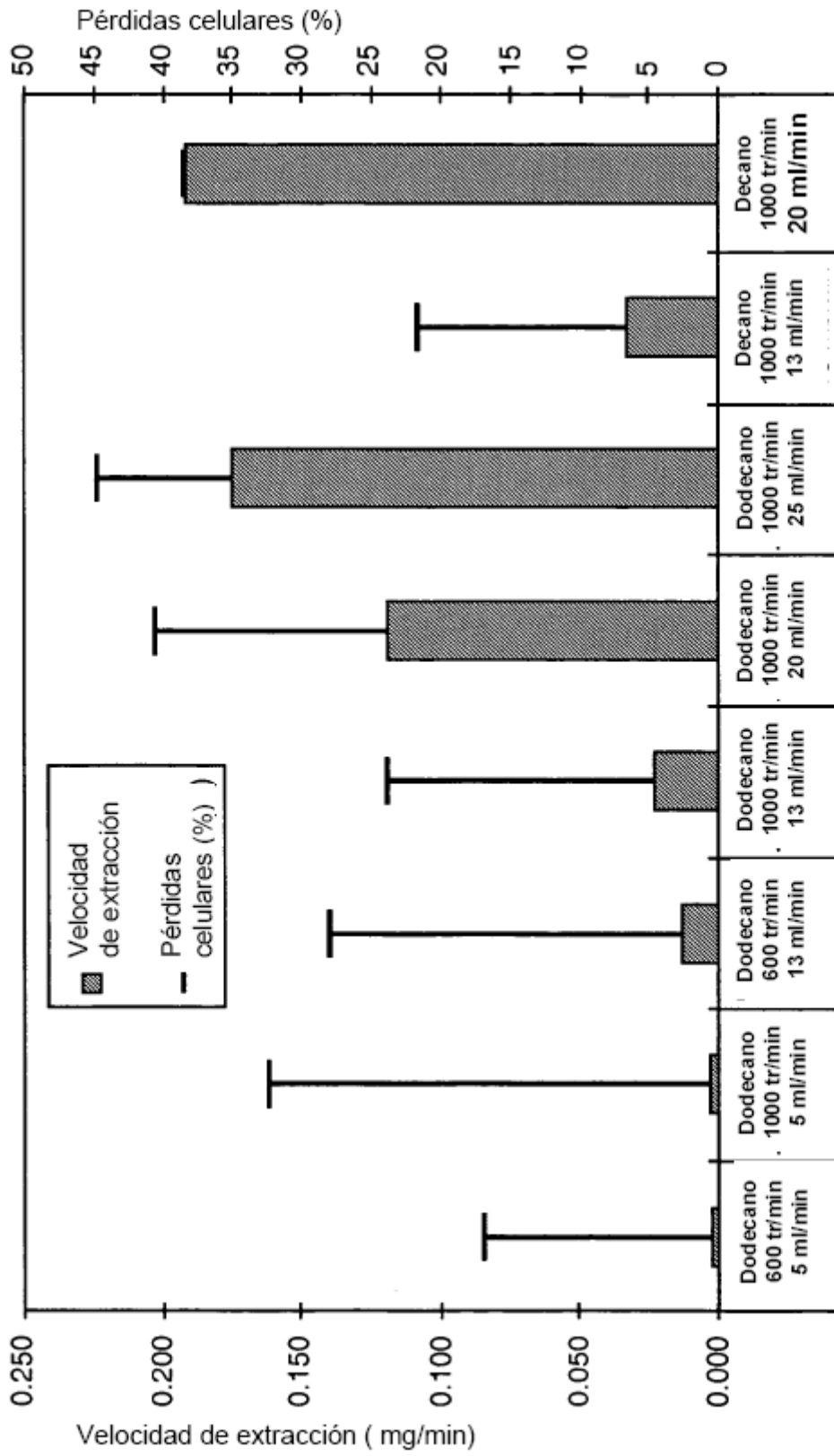


Fig. 3