

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 381 168**

51 Int. Cl.:  
**C12N 1/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **09777691 .8**  
96 Fecha de presentación: **06.08.2009**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2315825**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **04.05.2011**

54 Título: **Apertura celular de materiales de partida de origen vegetal o animal mediante una combinación de un procedimiento de pulverización y una descompresión para la extracción selectiva y segregación de las sustancias intracelulares valiosas**

30 Prioridad:  
**07.08.2008 DE 102008036723**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**23.05.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**23.05.2012**

73 Titular/es:  
**Uhde High Pressure Technologies GmbH  
Buschmühlenstrasse 20  
58093 Hagen, DE**

72 Inventor/es:  
**DIERKES, Heribert;  
STEINHAGEN, Volkmar;  
BORK, Michael;  
LÜTGE, Christoph y  
KNEZ, Zeljko**

74 Agente/Representante:  
**de Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 381 168 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

Apertura celular de materiales de partida de origen vegetal o animal mediante una combinación de un procedimiento de pulverización y una descompresión para la extracción selectiva y segregación de las sustancias intracelulares valiosas

5 La invención se refiere a un procedimiento para la apertura celular de materiales de partida de origen vegetal o animal mediante procedimientos de pulverización combinados con la descompresión de las células para la subsiguiente extracción selectiva y segregación de las sustancias en ellas contenidas.

10 A este respecto, métodos mecánicos conocidos para la apertura celular son por una parte la homogeneización con cuchillas rotativas, la cual se lleva a cabo generalmente a presión elevada, la apertura en un molino de bolas con mecanismo de agitación, el prensado de una muestra bajo elevada presión a través de una estrecha abertura o también el método mediante un homogeneizador de ultrasonidos.

15 El inconveniente de los métodos mecánicos citados son las fuerzas de cizalla que actúan sobre las células en virtud de la fricción, cuya superación a elevadas velocidades conduce a la formación de calor y, por consiguiente, da lugar a una elevada temperatura. Esto puede tener una influencia perjudicial sobre las sustancias contenidas en los extractos celulares que se originan.

20 Un método más cuidadoso lo representa la descompresión física de las células. Para ello, de forma correspondiente a la ley de Henry, un gas de suspensión se enriquece en células a elevadas presiones del gas y, mediante una brusca descompresión, se hace que revienten las membranas celulares. Esto sucede porque el gas liberado no puede escapar con la suficiente rapidez y acaba formando en el interior de las células burbujitas de gas que se van haciendo más grandes. Por ello, la carga mecánica que actúa sobre la célula se incrementa hasta que la célula revienta y se libera el contenido celular.

25 El inconveniente del método de la descompresión es sobre todo, que sólo se pueden abrir de forma efectiva células fáciles de romper, lo que hace necesario una aplicación adicional de procedimientos de apertura no mecánicos, tal como el empleo de enzimas. Esto, a su vez, hace que nuevamente un procedimiento de apertura a gran escala no sea rentable.

30 Según el estado de la técnica, la extracción se efectúa mediante fluidos supercríticos. Por ello, se entienden gases o líquidos que se encuentran por encima de su temperatura crítica y su presión crítica, definidas en el correspondiente diagrama de fases de la sustancia pura. La ventaja reside en una mayor solubilidad para sustancias difícilmente solubles en el intervalo supercrítico. Además de esto, la solubilidad se puede controlar también mediante variaciones de la presión y temperatura. Un ejemplo es la descafeinización de una planta de té mediante CO<sub>2</sub> supercrítico, como se describe en el documento WO 2008/05537 A1. Pero entre tanto, también se han establecido en la industria química y en la industria de los alimentos otras aplicaciones tales como, por ejemplo, la extracción de aceites, jengibre, pimienta negra o polvo de chili mediante CO<sub>2</sub> supercrítico o propano supercrítico.

35 La publicación WO 2008/061716 A1 describe, además, una mejora más del método de extracción, en el cual se prescinde de los agentes de arrastre, los cuales se emplean normalmente para garantizar un ulterior incremento de la solubilidad sin aumentar más la presión.

40 En el documento EP 0 941 140 B1 se describe la extracción de diferentes productos a partir de un medio de fermentación mediante dióxido de carbono, el cual se encuentra en estado supercrítico o próximo al estado crítico. La extracción que se describe en esta patente parte de una suspensión en base de agua. No se encuentra referencia alguna sobre una simultánea apertura celular ni de la extracción de las sustancias. Puesto que el disolvente supercrítico o, respectivamente, que se encontraba próximo al estado crítico, era dióxido de carbono, el cual presenta una solubilidad en agua relativamente buena, cabe esperar que se obtengan extractos con un elevado contenido en agua. Las temperaturas de extracción elegidas son, además, relativamente elevadas, por lo que pueden tener lugar las más diversas reacciones hidrolíticas de las sustancias extraídas con el agua.

45 El documento US 5,306,637 describe un método para la apertura celular, en el cual una apertura enzimática se acopla con una repentina descompresión subsiguiente, por lo que las células revientan y la sustancia de valor en ellas contenida se libera de forma efectiva. Sin embargo, las presiones empleadas son bajas, por lo que hay que contar con un tiempo de saturación largo. Esta invención utiliza dióxido de carbono, que se encuentra en estado supercrítico o próximo al estado supercrítico, al cual opcionalmente se añaden agentes de arrastre tales como óxido de azufre, monóxido de nitrógeno, peróxido de hidrógeno, etanol o mezclas de estos agentes de arrastre para la apertura celular microbianas, así como para la extracción de componentes intracelulares tales como proteínas o ácidos nucleicos. El aislamiento de proteínas o ácidos nucleicos no se basa en la solubilidad de estas sustancias en los gases utilizados, sino que se basa en la precipitación de estas sustancias a partir de la suspensión. La recuperación de las mezclas de gases es en este caso extremadamente problemática y el proceso aquí descrito no encuentra ninguna aplicación a escala industrial.

55 En el documento WO91/01367 se elige primeramente un disolvente que se presente en forma de gas y que presente un temperatura crítica situada entre 0 y 100°C. Este disolvente se lleva a una presión que se encuentra en la

- proximidad o también por encima de la presión crítica del correspondiente disolvente, y a una temperatura que se encuentra en la proximidad de la temperatura crítica del correspondiente disolvente. El disolvente se reúne a continuación con una suspensión del material celular para saturar las células con el disolvente bajo las condiciones expuestas. En la siguiente etapa se reduce la presión, lo que lleva a una destrucción parcial de la membrana celular y a la liberación de componentes celulares. Después de esto, el material celular abierto se introduce en un segundo recipiente. Pero tal como se conoce del estado actual de la técnica, hay que contar con que las proteínas y ácidos nucleicos liberados, que de esta manera se han de disolver en disolventes que se encuentran en estado supercrítico o en la proximidad del estado crítico, presenten una solubilidad extremadamente baja.
- De ello resulta que, a pesar de la mejora permanente de los métodos que se encuentren para la apertura celular en el estado actual de la técnica, permanecen aún en el extracto celular considerables restos de la sustancia a aislar.
- Por consiguiente, sigue igual que antes la necesidad de conseguir, por mejoras de los procesos existentes, un rendimiento y pureza lo mayor posible de las deseadas sustancias intracelulares de valor difícilmente solubles, a partir del extracto celular en un disolvente supercrítico o en un disolvente que se encuentre próximo al estado crítico, lo cual constituye el objeto de la invención que aquí se va a describir.
- Este objetivo se soluciona mediante el procedimiento conforme a la invención para la apertura celular de materiales de partida biogénicos en suspensión, mediante la combinación de aplicación de presión, pulverización y descompresión con subsiguiente extracción y separación de las sustancias celulares de valor, sirviendo al menos un depósito de reserva como colector de carga previa para una suspensión del material de partida biogénico y utilizándose al menos otro depósito de reserva como colector de carga previa para un disolvente, preparándose en una unidad para la apertura de células un extracto celular, a continuación en una etapa de extracción el extracto celular es atravesado por una corriente de gas, y el gas cargado con sustancias celulares de valor es separado en una etapa de segregación por reducción de la presión de las sustancias celulares de valor. La suspensión de material de partida biogénico se lleva en este caso, mediante un dispositivo para la subida de presión, a una presión de 100 – 2500 bar, el disolvente se lleva igualmente mediante un dispositivo de subida de presión a una presión de 100 – 2500 bar, a continuación de lo cual el disolvente y la suspensión se reúnen en una conducción bajo una presión de 100 – 2500 bar y se mezclan para dar una mezcla en solución y, a continuación, la mezcla en solución, a través de al menos una tobera bajo una presión de 100 – 2500 bar y una temperatura de 10 – 90°C, se pulveriza en un depósito que presenta una menor presión. Mediante este método se consigue que la apertura celular del material de partida biogénico en suspensión y la disolución de las sustancias celulares de valor tengan lugar simultáneamente.
- En este caso vale en general, que la apertura celular mejora cuanto mayor sea la presión elegida para la mezcla en solución de material celular biogénico, suspendido, y disolvente. En relación a los costes de equipo y por razones técnicas del proceso es ventajoso en este caso moverse en un intervalo de presión entre 1300 y 1600 bar.
- En una forma de ejecución de la invención, el disolvente con el cual se mezcla la suspensión de material de partida biogénico, se selecciona de un grupo que contiene etano, etileno, propano, propileno, butano, butileno, otros hidrocarburos saturados o insaturados, dióxido de carbono, gas hilarante, éter de dimetilo, hexafluoruro de azufre, freones tales como, por ejemplo, R134a, R125, R32, R141b, y mezclas de ellos. Opcionalmente, el disolvente con el cual se mezcla la suspensión de material de partida biogénico es un fluido supercrítico, que no es un hidrocarburo. El disolvente que se encuentra en estado supercrítico o próximo al estado crítico se caracteriza porque el agua es prácticamente insoluble en él.
- Opcionalmente, la suspensión del material de partida biogénico se puede saturar o sobresaturar con el disolvente antes de la pulverización.
- En otra forma de ejecución ventajosa del procedimiento el material de partida biogénico antes de la formación de la suspensión se puede tratar previamente por lavado, filtración, fragmentación, molienda o tamizado.
- Otras posibles formas de ejecución del procedimiento conforme a la invención para la apertura celular del material de partida biogénico, suspendido, mediante la aplicación de presión, pulverización y descompresión se refieren al enlace con otros procedimientos de apertura. En este caso, estos procedimientos de apertura se seleccionan o bien de un grupo de procedimientos mecánicos, el cual comprende la apertura celular mediante homogeneizador de alta presión, molino de bolas, homogeneizador de ultrasonidos, prensa francesa y dispositivos para chorreado. Alternativamente, estos procedimientos de apertura se seleccionan de un grupo de métodos químicos, el cual comprende la apertura celular mediante antibióticos, formadores de quelatos, agentes caotrópicos, detergentes y tratamiento alcalino. En este caso, las paredes celulares o bien se permeabilizan o se saponifican. Además de esto, existe la posibilidad de enlazar el procedimiento conforme a la invención con un procedimiento de apertura seleccionado de un grupo de métodos biológicos, el cual comprende la apertura celular mediante enzimas, fagos o autólisis. Opcionalmente, este procedimiento se puede seleccionar también de un grupo de métodos físicos, el cual comprende la apertura celular mediante congelación y descongelación, termólisis o descompresión.
- Opcionalmente, el material de partida biogénico suspendido, utilizado, se compone de algas.

Otras posibles formas de ejecución del procedimiento se refieren a las sustancias celulares de valor que se han de extraer. Éstas son, por una parte sustancias celulares de valor de tipo carotinoide tales como carotinas o xantofilas. Alternativamente, se trata de la sustancia celular de valor astaxantina que se ha de extraer. Además de esto, se considera la extracción de sustancias celulares de valor del tipo de sustancias grasas y aceites, las cuales están contenidas en el material de partida biogénico, suspendido.

Un ejemplo de ejecución de la invención se representa en la Fig. 1 y se describe con más detalle a continuación.

La Fig 1. muestra un esquema del procedimiento conforme a la invención para la apertura celular de materiales de partida biogénicos, suspendidos, mediante la combinación de aplicación de presión, pulverización y descompresión con subsiguiente extracción selectiva y separación de sustancias celulares de valor.

La **Fig. 1** muestra un depósito **1** de reserva para la recepción del material de partida biogénico suspendido, así como otro depósito **4** de reserva para la recepción del disolvente. El material de partida biogénico **2**, suspendido, se lleva a una presión entre 100 y 2500 bar por medio de una bomba **3**. El disolvente **5** se lleva igualmente a una presión entre 100 y 2500 bar por medio de una bomba **6**. Así, el material de partida biogénico **2** suspendido y el disolvente **5** se pueden llevar a la misma presión o, de forma alternativa, se pueden diferenciar las presiones. Seguidamente, el material de partida biogénico **7** que se encuentra bajo presión se puede reunir entonces con el disolvente **8** que se encuentra bajo presión en una conducción para dar una mezcla en solución **9**, la cual se encuentra igualmente bajo una presión entre 100 y 2500 bar. Esta presión en la conducción se controla a través de un instrumento de medida de presión **10**. La mezcla en solución **9** se introduce después en un depósito **12** que presenta una presión menor que la mezcla en solución, por lo que la introducción de la mezcla en solución tiene lugar a través de las toberas **11**, las cuales introducen la mezcla en solución **9** por pulverización en el depósito **12**. Por tanto, de este modo la reducción de presión y el proceso de pulverización de la mezcla en solución **9** se efectúan simultáneamente. En el depósito **12** se introduce un disolvente para la extracción **16**, el cual se aporta en contracorriente a la mezcla en solución **9**. El disolvente para la extracción **16** procede en este caso del depósito de reserva **4** y corresponde así con el que se utiliza también para la apertura celular mediante la combinación del procedimiento de pulverización y la descompresión. La propia extracción se lleva a cabo según condiciones estándar del estado actual de la técnica. Las sustancias extraídas, incluido el disolvente, se transportan en la corriente **13** a un depósito **14**, el cual actúa como separador, en el cual las sustancias extraídas se separan del disolvente después de la reducción de la presión. El disolvente así recuperado se lleva de nuevo al depósito de reserva **4** para la recepción de disolvente, a través de un conducción de retorno **15**, y las sustancias extraídas se sustraen del depósito **14** en forma de la corriente **18**.

Alternativamente, el disolvente **17** se lleva para la extracción al depósito **14**, el cual en este caso actúa como depósito de extracción, llevando el disolvente en contracorriente a la corriente **13**, la cual representa en este caso el material de apertura celular del depósito **12**. En este caso, la extracción se lleva a cabo según condiciones estándar del estado de la técnica. La presión en la extracción se mantiene igual, en comparación con la presión que reina en el depósito **12**. En esta variante del procedimiento se requiere entonces un depósito adicional que funcione como separador (no mostrado en Fig. 1).

Los parámetros de proceso que hay que mantener son óptimos en el caso de la utilización de CO<sub>2</sub> como disolvente **5** en un intervalo de presión de 300 a 2500 bar, en un intervalo de temperatura de 10°C a 90°C y en una relación de disolvente **5** a material de partida biogénico **2**, suspendido, de 5 a 90 kg/kg. Si el procedimiento se lleva a cabo utilizando hidrocarburos de C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>, el intervalo de presión se puede fijar en valores entre 100 y 2500 bar, teniendo que limitarse la relación de disolvente **5** a material de partida biogénico **2**, suspendido, a 1 hasta 60 kg/kg.

El procedimiento se puede realizar tanto en funcionamiento por tandas, como en procedimiento continuo.

Por las condiciones de proceso así definidas, las cuales se caracterizan por una presión muy elevada, baja temperatura y a ser posible una forma de proceso continua, se pueden obtener las sustancias celulares de valor en gran concentración y elevada pureza.

A continuación, con ayuda de dos ejemplos se deben establecer los límites entre el procedimiento conforme a la invención y aquel del estado de la técnica tal como se describe en el documento WO91/01367 A1.

#### **Ejemplo 1:**

A. Procedimiento conforme a la invención:

1kg de suspensión acuosa del alga *Hematococcus pluvialis*, que presenta una concentración de material sólido de 181,1 g/kg y un contenido en aceite de aproximadamente 13,7% en peso (referido al peso en seco) se lleva mediante una bomba a una presión de 1500 bar y, a continuación, se mezcla a presión con el disolvente CO<sub>2</sub>. La mezcla en solución así obtenida se pulveriza a través de una tobera en un depósito de presión a una presión más baja, de 300 bar. Por la descompresión, combinada con el proceso de la pulverización, las algas se abren en la mezcla en solución y la mezcla en solución se pulveriza finamente en el depósito de presión. La mezcla en solución con las algas abiertas, pulverizada, se extrae a continuación en contracorriente a 300 bar, sin variación de la presión, con el disolvente CO<sub>2</sub> en el depósito de presión. Las sustancias extraídas se transportan con el disolvente

CO<sub>2</sub> a un separador, en el cual las sustancias extraídas se separan del disolvente después de reducir la presión. En este ejemplo, la relación de disolvente CO<sub>2</sub> a material de partida biogénico, suspendido, es de 90 kg/kg.

5 El producto obtenido en este caso es de aproximadamente 0,27 kg y se compone de una emulsión de aceite en agua, separándose la fase que contiene aceite por sedimentación. De ello resulta entonces una cantidad total en aceite obtenido de 20,1 g/kg de la suspensión de algas.

B.Procedimiento según el estado actual de la técnica:

10 1kg de suspensión acuosa del alga Hematococcus pluvialis, que presenta una concentración de material sólido de 181,1 g/kg y un contenido en aceite de aproximadamente 13,7% en peso (referido al peso en seco) se lleva con ayuda de una bomba a una presión de 1500 bar y, a continuación, se mezcla a presión con el disolvente CO<sub>2</sub>. La mezcla en solución así obtenida se descomprime a la presión atmosférica a través de una tobera en un depósito, pero no se pulveriza finamente. Por la descompresión las algas se abren en la mezcla en solución. A continuación, la suspensión de algas abiertas se lleva a un depósito de presión con una presión de 300 bar y allí se pulveriza. La mezcla en solución con las algas abiertas, pulverizada, se extrae en contracorriente con la mezcla en solución. Por tanto, en este procedimiento la descompresión y la pulverización tienen lugar en dos etapas sucesivas del proceso y no simultáneamente. A continuación, las sustancias extraídas se transportan con el disolvente a un separador, en el cual las sustancias extraídas se separan del disolvente después de reducir la presión. En este ejemplo, la relación de disolvente CO<sub>2</sub> a material de partida biogénico, suspendido, es de 110 kg/kg.

20 El producto obtenido en este caso es de aproximadamente 0,20 kg y se compone de una emulsión de aceite en agua, separándose la fase que contiene aceite por sedimentación. De ello resulta entonces una cantidad total en aceite obtenido de 15,8 g/kg de la suspensión de algas.

Los resultados obtenidos según el ejemplo 1 se pueden interpretar como que por el procedimiento conforme a la invención se pudo conseguir un aumento en el rendimiento del producto del 21,4%.

### Ejemplo 2:

A.Procedimiento conforme a la invención:

25 1kg de suspensión acuosa del alga Hematococcus pluvialis, que presenta una concentración de material sólido de 181,1 g/kg y un contenido en aceite de aproximadamente 13,7% en peso (referido al peso en seco) se lleva mediante una bomba a una presión de 1000 bar y, a continuación, se mezcla a presión con el disolvente propano. La mezcla en solución así obtenida se pulveriza a través de una tobera en un depósito de presión a una presión más baja, de 50 bar. Por la descompresión, combinada con el proceso de la pulverización, las algas se abren en la mezcla en solución y la mezcla en solución se pulveriza finamente en el depósito de presión. La mezcla en solución con las algas abiertas, pulverizada, se extrae a continuación en contracorriente a 50 bar, sin variación de la presión, con el disolvente propano en el depósito de presión. Las sustancias extraídas se transportan con el disolvente a un separador, en el cual las sustancias extraídas se separan del disolvente después de reducir la presión. En este ejemplo, la relación de disolvente propano a material de partida biogénico, suspendido, es de 8 kg/kg.

35 El producto obtenido en este caso se compone de aceite casi puro. La cantidad total en aceite obtenido es de 22,1 g/kg de la suspensión de algas.

B.Procedimiento según el estado actual de la técnica:

40 1kg de suspensión acuosa del alga Hematococcus pluvialis, que presenta una concentración de material sólido de 181,1 g/kg y un contenido en aceite de aproximadamente 13,7% en peso (referido al peso en seco) se lleva con ayuda de una bomba a una presión de 1000 bar y, a continuación, se mezcla a presión con el disolvente propano. La mezcla en solución así obtenida se descomprime a la presión atmosférica a través de una tobera en un depósito, pero no se pulveriza finamente. Por la descompresión las algas se abren en la mezcla en solución. A continuación, la suspensión de algas abiertas se lleva a un depósito de presión con una presión de 50 bar y allí se pulveriza. La mezcla en solución con las algas abiertas, pulverizada, se extrae en contracorriente con la mezcla en solución. Por tanto, en este procedimiento la descompresión y la pulverización tienen lugar en dos etapas sucesivas del proceso y no simultáneamente. A continuación, las sustancias extraídas se transportan con el disolvente a un separador, en el cual las sustancias extraídas se separan del disolvente después de reducir la presión. En este ejemplo, la relación de disolvente propano a material de partida biogénico, suspendido, es de 11 kg/kg.

50 El producto obtenido en este caso se compone de aceite casi puro. La cantidad total en aceite obtenido de 18,8 g/kg de la suspensión de algas.

Los resultados obtenidos del ejemplo 2 se pueden interpretar como que por el procedimiento conforme a la invención se pudo conseguir un aumento en el rendimiento del producto del 15%.

### Ejemplo 3:

A.Procedimiento conforme a la invención:

0,9 kg de suspensión acuosa del alga *Hematococcus pluvialis*, que presenta una concentración de material sólido de 181,1 g/kg y un contenido en astaxantina de aproximadamente 3,0% en peso (referido al peso en seco) se lleva mediante una bomba a una presión de 2400 bar y, a continuación, se mezcla a presión con el disolvente CO<sub>2</sub>. La mezcla en solución así obtenida se pulveriza a través de una tobera en un depósito de presión a una presión más baja, de 500 bar. Por la descompresión, combinada con el proceso de la pulverización, las algas se abren en la mezcla en solución y la mezcla en solución se pulveriza finamente en el depósito de presión. La mezcla en solución con las algas abiertas, pulverizada, se extrae a continuación en contracorriente con el disolvente CO<sub>2</sub> a 500 bar, sin variación de la presión, en el depósito de presión. Las sustancias extraídas se transportan con el disolvente CO<sub>2</sub> a un separador, en el cual las sustancias extraídas se separan del disolvente después de reducir la presión. En este ejemplo, la relación de disolvente CO<sub>2</sub> a material de partida biogénico suspendido es de 88 kg/kg.

El producto obtenido en este caso es de aproximadamente 0,29 kg y se compone de una emulsión de aceite, astaxantina y agua, separándose la fase que contiene aceite por sedimentación. A partir de la fase que contiene aceite se puede aislar después astaxantina con un rendimiento de 88,1% referido a la cantidad total de astaxantina del material de algas empleado

15 B.Procedimiento según el estado actual de la técnica:

0,9 kg de suspensión acuosa del alga *Hematococcus pluvialis*, que presenta una concentración de material sólido de 181,1 g/kg y un contenido en astaxantina de aproximadamente 3,0% en peso (referido al peso en seco) se lleva con ayuda de una bomba a una presión de 2400 bar y, a continuación, se mezcla a presión con el disolvente CO<sub>2</sub>. La mezcla en solución así obtenida se descomprime a la presión atmosférica a través de una tobera en un depósito, pero no se pulveriza finamente. Por la descompresión las algas se abren en la mezcla en solución. A continuación, la suspensión de algas abiertas se lleva a un depósito de presión con una presión de 500 bar y allí se pulveriza. La mezcla en solución con las algas abiertas, pulverizada, se extrae en contracorriente con la mezcla en solución. Por tanto, en este procedimiento la descompresión y la pulverización tienen lugar en dos etapas sucesivas del proceso y no simultáneamente. A continuación, las sustancias extraídas se transportan con el disolvente a un separador, en el cual las sustancias extraídas se separan del disolvente después de reducir la presión. En este ejemplo, la relación de disolvente CO<sub>2</sub> a material de partida biogénico suspendido es de 115 kg/kg.

El producto obtenido en este caso es de aproximadamente 0,22 kg y se compone de una emulsión de aceite, astaxantina y agua, separándose la fase que contiene aceite por sedimentación. A partir de la fase que contiene aceite se puede aislar después astaxantina con un rendimiento de 72,3% referido al contenido total en astaxantina del material de algas empleado.

Los resultados obtenidos del ejemplo 3 se pueden interpretar como que por el procedimiento conforme a la invención se pudo conseguir un aumento en el rendimiento del producto del 21,8%.

#### Ejemplo 4:

A.Procedimiento conforme a la invención:

0,9 kg de suspensión acuosa del alga *Hematococcus pluvialis*, que presenta una concentración de material sólido de 181,1 g/kg y un contenido en astaxantina de aproximadamente 3,0% en peso (referido al peso en seco) se lleva mediante una bomba a una presión de 1600 bar y, a continuación, se mezcla a presión con el disolvente butano. La mezcla en solución así obtenida se pulveriza a través de una tobera en un depósito de presión a una menor presión de 150 bar. Por la descompresión, combinada con el proceso de la pulverización, las algas se abren en la mezcla en solución y la mezcla en solución se pulveriza finamente en el depósito de presión. La mezcla en solución con las algas abiertas, pulverizada, se extrae a continuación en contracorriente a 150 bar, sin variación de la presión, con el disolvente butano en el depósito de presión. Las sustancias extraídas se transportan con el disolvente butano a un separador, en el cual las sustancias extraídas se separan del disolvente después de reducir la presión. En este ejemplo, la relación de disolvente butano a material de partida biogénico, suspendido, es de 8 kg/kg.

El producto obtenido en este caso es de aproximadamente 26,1 g y se compone de aceite y astaxantina. A partir de la fase que contiene aceite se puede aislar después astaxantina con un rendimiento de 92,6% referido a la cantidad total de astaxantina del material de algas empleado

B.Procedimiento según el estado actual de la técnica:

0,9 kg de suspensión acuosa del alga *Hematococcus pluvialis*, que presenta una concentración de material sólido de 181,1 g/kg y un contenido en astaxantina de aproximadamente 3,0% en peso (referido al peso en seco) se lleva con ayuda de una bomba a una presión de 1600 bar y, a continuación, se mezcla a presión con el disolvente butano. La mezcla en solución así obtenida se descomprime a la presión atmosférica a través de una tobera en un depósito, pero no se pulveriza finamente. Por la descompresión las algas se abren en la mezcla en solución. A continuación, la suspensión de algas abiertas se lleva a un depósito de presión con una presión de 150 bar y allí se pulveriza. La mezcla en solución con las algas abiertas, pulverizada, se extrae en contracorriente con la mezcla en solución. Por tanto, en este procedimiento la descompresión y la pulverización tienen lugar en dos etapas sucesivas del proceso y no simultáneamente. A continuación, las sustancias extraídas se transportan con el disolvente a un separador, en el

cual las sustancias extraídas se separan del disolvente después de reducir la presión. En este ejemplo, la relación del disolvente butano a material de partida biogénico, suspendido, es de 11 kg/kg.

5 El producto obtenido en este caso es de aproximadamente 0,22 kg y se compone de aceite y astaxantina. A partir de la fase que contiene aceite se puede aislar después astaxantina con un rendimiento de 78,4% referido al contenido total en astaxantina del material de algas empleado.

Los resultados obtenidos según el ejemplo 4 se pueden interpretar como que por el procedimiento conforme a la invención se pudo conseguir un aumento en el rendimiento del producto del 18,1%.

Ventajas que resultan de la invención:

- 10 • se trata de un método cuidadoso para la apertura celular, puesto que la carga química y física que actúa sobre los componentes celulares interiores es tan solo baja.
- un incremento del grado de apertura de las muestras hasta llegar a la apertura de orgánulos subcelulares difícilmente accesibles, tales como núcleos celulares o mitocondrias.
- un grado de homogeneización uniforme después de la apertura celular facilita la subsiguiente extracción.
- se puede prescindir de un secado complejo del material de partida.
- 15 • elevada concentración y elevada pureza de las sustancias celulares de valor, deseadas.

**Lista de referencias**

- 1 Depósito de reserva para la recepción de material de partida biogénico, suspendido
- 2 Material de partida biogénico, suspendido
- 3 Bomba
- 20 4 Depósito de reserva
- 5 Disolvente
- 6 Bomba
- 7 Material de partida biogénico, suspendido, que se encuentra bajo presión
- 8 Disolvente que se encuentra bajo presión
- 25 9 Mezcla en solución
- 10 Dispositivo para la medición de presión
- 11 Toberas de inyección
- 12 Depósito
- 13 Corriente
- 30 14 Depósito
- 15 Reciclado
- 16 Disolvente para la extracción
- 17 Disolvente
- 18 Corriente
- 35 19 Sustancias extraídas

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento para la apertura celular de materiales de partida biogénicos, suspendidos, mediante la combinación de aplicación de presión, pulverización y descompresión con subsiguiente extracción selectiva y separación de sustancias celulares de valor, en el cual
  - 5 al menos un depósito de reserva sirve como colector para una suspensión de material de partida biogénico, y
    - al menos otro depósito de reserva se utiliza como colector para un disolvente,
    - en una unidad para la apertura celular se prepara un extracto celular, a continuación
    - en una etapa de extracción, el extracto celular es atravesado por gas, y
  - 10 el gas cargado con sustancias celulares de valor se separa de las sustancias celulares de valor, en una etapa de segregación bajo reducción de la presión,
    - la suspensión de material de partida biogénico se lleva a una presión de 100-2500 bar mediante un dispositivo para elevar la presión,
    - el disolvente se lleva a una presión de 100-2500 bar mediante un dispositivo para elevar la presión,
  - 15 el disolvente y la suspensión se juntan en una conducción bajo una presión de 100-2500 bar y se mezclan para dar una mezcla en solución,

**caracterizado porque**

la mezcla en solución a través de al menos una tobera bajo una presión de 100-2500 bar y una temperatura de 10-90°C se pulveriza en un depósito, el cual presenta una presión más baja.

- 20 2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado porque** el disolvente con el cual se mezcla la suspensión de material de partida biogénico, se selecciona de un grupo que contiene etano, propano, butano, dióxido de carbono, gas hilarante, etileno, propileno, butileno, otros hidrocarburos saturados o insaturados, éter de dimetilo, hexafluoruro de azufre, freones tales como, por ejemplo, R134a, R125, R32, R141b, y mezclas de ellos.
- 25 3. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizado porque** el disolvente con el que se mezcla la suspensión de material de partida biogénico, es un fluido supercrítico, que no es un hidrocarburo.
4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado porque** la suspensión de material de partida biogénico, antes de la pulverización, se satura con el disolvente.
5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado porque** la suspensión de material de partida biogénico, antes de la pulverización, se sobresatura con el disolvente.
- 30 6. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado porque** el disolvente utilizado se recupera y se recicla al depósito de reserva para el disolvente.
7. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado porque** el material de partida biogénico, antes de la formación de la suspensión, se trata previamente por lavado, filtración, fragmentación, molienda o tamizado.
- 35 8. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado porque** el procedimiento para la apertura celular del material de partida biogénico, suspendido, mediante la combinación de aplicación de presión, pulverización y descompresión, se enlaza con otros procedimientos de apertura que se seleccionan de un grupo de procedimientos mecánicos, el cual comprende la apertura celular mediante homogeneizador de alta presión, molino de bolas, homogeneizador de ultrasonidos, prensa francesa y dispositivos para chorreado.
- 40 9. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizado porque** el procedimiento para la apertura celular del material de partida biogénico, suspendido, mediante la combinación de aplicación de presión, pulverización y descompresión, se enlaza con otros procedimientos de apertura que se seleccionan de un grupo de métodos químicos, el cual comprende la apertura celular mediante antibióticos, formadores de quelatos, agentes caotrópicos, detergentes y tratamiento alcalino.
- 45 10. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 9, **caracterizado porque** el procedimiento para la apertura celular del material de partida biogénico, suspendido, mediante la combinación de aplicación de presión, pulverización y descompresión, se enlaza con otros procedimientos de apertura que se seleccionan de un grupo de métodos biológicos, el cual comprende la apertura celular mediante enzimas, fagos o autólisis.

- 5 11. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 10, **caracterizado porque** el procedimiento para la apertura celular del material de partida biogénico, suspendido, mediante la combinación de aplicación de presión, pulverización y descompresión, se enlaza con otros procedimientos de apertura que se seleccionan de un grupo de métodos físicos, el cual comprende la apertura celular mediante congelación y descongelación, termolisis o descompresión.
12. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 11, **caracterizado porque** el material de partida biogénico, suspendido, utilizado son algas.
- 10 13. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 12, **caracterizado porque** se extraen sustancias celulares de valor de tipo carotinoide tales como carotinas o xantofilas, las cuales están contenidas en el material de partida biogénico, suspendido.
14. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 13, **caracterizado porque** se extrae la sustancia celular de valor astaxantina, la cual está contenida en el material de partida biogénico, suspendido.
- 15 15. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 14, **caracterizado porque** se extraen sustancias celulares de valor de tipo grasas y aceites, las cuales están contenidas en el material de partida biogénico, suspendido.
16. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 15, **caracterizado porque** la relación de disolvente a material de partida biogénico, suspendido, se encuentra en el intervalo de 1 a 90kg/kg.

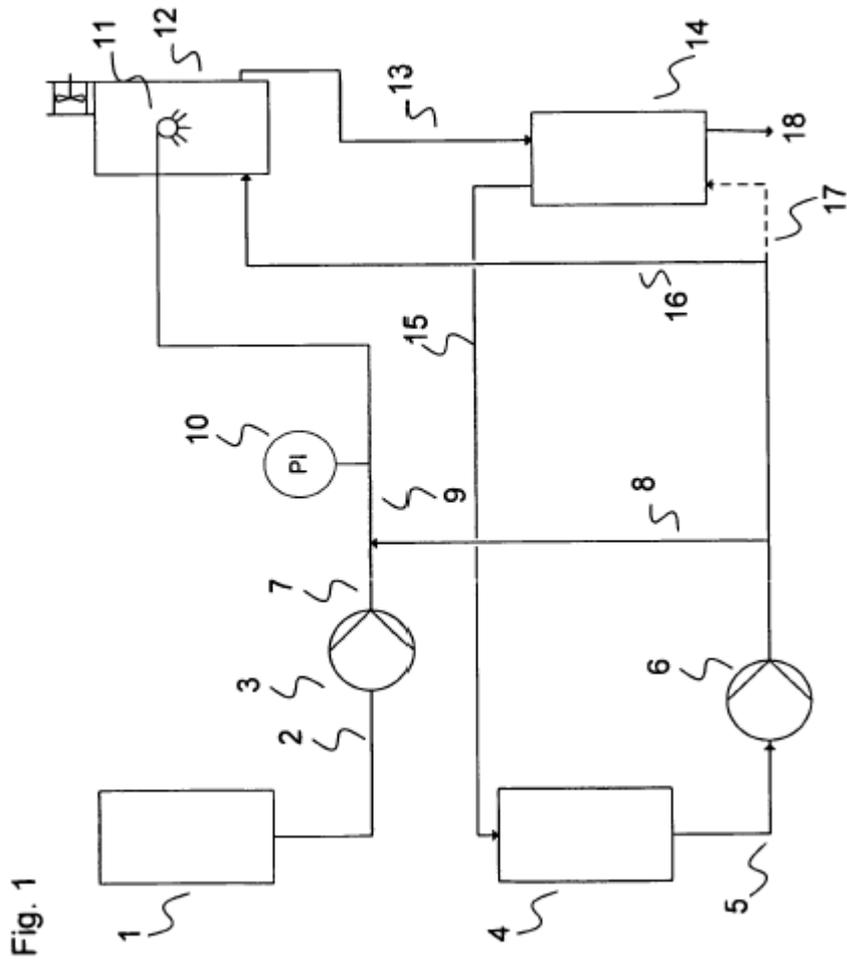


Fig. 1