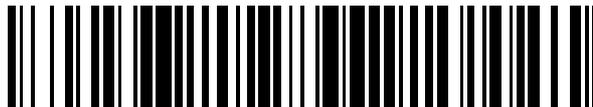


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 627 948**

51 Int. Cl.:

**C12N 1/06** (2006.01)

**C12P 7/64** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.12.2013 PCT/IB2013/060813**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.06.2014 WO14097057**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.12.2013 E 13826947 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.03.2017 EP 2935561**

54 Título: **Método para recuperar componentes intracelulares a partir de microorganismos fermentados**

30 Prioridad:

**20.12.2012 IT MI20122195**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**01.08.2017**

73 Titular/es:

**ENI S.P.A. (100.0%)  
Piazzale E. Mattei 1  
00144 Rome, IT**

72 Inventor/es:

**MIGLIO, ROBERTA y  
MONTINI, ALFREDO**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU SLP, .**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 627 948 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**

Método para recuperar componentes intracelulares a partir de microorganismos fermentados

La presente invención se refiere a un método para recuperar componentes intracelulares de materiales de origen biológico, tales como levaduras, algas, bacterias y/o mohos.

5 Se sabe en la técnica que las suspensiones de microorganismos celulares pueden lisarse por perturbación y rotura de la membrana celular, por ejemplo, por variaciones en la presión osmótica. La simple disminución de la fuerza iónica del entorno líquido, por ejemplo, o la adición de un tensioactivo con agitación moderada de la suspensión, permite que las células se hinchen y dejen que se lisen. En otros casos, por otra parte, es necesaria una agitación vigorosa de la suspensión, junto con una fuerte acción térmica, mecánica o sónica para romper las membranas celulares, con un aumento en los costes de la lisis celular. Las células de bacterias, levaduras y algas, por ejemplo, son mucho más resistentes y su lisis para recuperar los componentes intracelulares es difícil de modo que se debe recurrir a métodos más eficaces que la ósmosis para obtenerlos.

En "Disruption of microbial cells for intracellular products", Enzim Microb Tech., 1986, vol. 8, se describen los métodos principales para la rotura de la pared celular, que son:

15 a) Métodos mecánicos:

- por medio de fuerzas de fricción entre las células y un material sólido, por ejemplo con molinos de perlas o prensas X o prensas Hughes;
- por medio de fuerzas de fricción en una suspensión de células, por ejemplo con ultrasonidos o con homogeneizadores de alta presión o con las denominadas prensas francesas.

20 B) Métodos no mecánicos:

- mediante lisis enzimática y química (con detergentes, disolventes o antibióticos) o lisis física (choque o presión osmótica). En procesos industriales que, al final de la fermentación, prevén la recogida de microorganismos y su rotura o lisis celular para liberar el producto intracelular, a menudo acompañan a los residuos de la célula una fase oleosa y acuosa enzimática.

25 Una aproximación a la extracción de aceites de semillas seguida por la industria es el uso de unidades de proceso (malaxación) que tienen un volumen adecuado agitado por hojas helicoidales que giran a una velocidad de 20-30 rpm y garantizan un tiempo de residencia adecuado (1-2 ó más horas) para el proceso de rotura para liberar las vacuolas aceitosas. Este proceso se lleva a cabo a baja temperatura (20-30°C) en aire.

30 Una planta industrial puede comprender generalmente más amasadoras dispuestas en serie (en este caso a menudo superpuestas para limitar el espacio de estancamiento) o en paralelo, cargadas mecánicamente, por medio de un sistema hidráulico, saliendo la pasta de aceite de la trituradora. Este proceso produce una lisis térmica blanda que, asociada a una remezcla lenta de la pasta, permite la liberación de la fase aceitosa, que se separa luego por un proceso de flotación. Esta tecnología es eficaz para microorganismos de dimensiones superiores a unas pocas decenas de micras, pero no es eficaz para microorganismos resistentes, como algunos, pero no sólo, de las especies *Lypomyces*, *Rhodotorula* y *Cryptococcus*. Los parámetros técnicos indicados para este proceso son la temperatura y la duración de la operación. La temperatura es fundamental para el rendimiento en la extracción posterior y está estrictamente asociada con la fase de liberación del contenido celular. El parámetro tiempo se correlaciona con el modo operativo.

40 Otro tipo de máquina industrial capaz de efectuar este proceso para casos de lisis celular que requieran condiciones drásticas de temperatura y presión, es una máquina constituida por un cilindro fijo o giratorio, equipado con cuchillas internas o mezcladoras capaces de mezclar, romper y llevar a las células a ser lisadas. Esta máquina se utiliza en la industria alimentaria para la hidrólisis térmica y, a veces, en ambientes ácidos para ácidos sulfúricos (véase por ejemplo las máquinas Anco-Eaglin Inc).

45 La solicitud de patente estadounidense US 2010/0006515 A1 describe una máquina para la lisis celular termomecánica que actúa como prensa de tornillo para presiones superiores a 5 bar (500 kPa) y temperaturas superiores a 120°C. En la descripción se indica que esta máquina también puede llevar a cabo una separación de los líquidos celulares durante el proceso de lisis térmica para productos celulares con membranas caracterizadas por una fuerte resistencia térmica/mecánica a la rotura.

50 El uso de molinos de bolas de vidrio o de cerámica permite una agitación fuerte y la rotura de las células de la pasta a lisar. El método se ha utilizado durante años y se considera que es aplicable al grupo biológico de levaduras y hongos, microbacterias, esporas y microalgas. Recientemente se ha aplicado a muestras de suelo y pequeñas muestras de tejidos vegetales y animales.

Aunque ambos métodos, los basados en molinos y en los tambores de tornillo, son eficaces para ciertos tipos de células, se caracterizan por un alto costo de operación y también costo del equipo. Este último se deriva de los

tiempos necesarios para efectuar la acción de lisis y, a veces, debido a la agresividad química de los ambientes de crecimiento que acompañan a los microorganismos celulares, como en el caso de algas, donde la presencia de cloro requiere el uso de materiales altamente resistentes; materiales tales como aleaciones basadas principalmente en níquel y cromo.

- 5 Más recientemente, se han utilizado métodos basados en procesos de lisis sónicos o magnéticos, lo que implica un menor coste de energía final.

10 La sonicación intensa de líquidos, por ejemplo, genera ondas sonoras que se propagan en medios líquidos con ciclos alternos de alta y baja presión. Durante el ciclo de baja presión, se crea una alta intensidad de burbujas de vacío de pequeño tamaño en el líquido. Por lo tanto, se utiliza un proceso de cavitación para la implosión de las burbujas líquidas, lo que permite generar fuerzas de cizallamiento que son capaces de romper mecánicamente la estructura celular. Este efecto se utiliza para la extracción de lípidos de algas. Para que la separación de la fase oleosa/lipídica de la fase acuosa y de los restos celulares sea efectiva, se requiere la adición de un disolvente, ya que de otro modo los restos celulares permanecerían englobados en la fase oleosa/lipídica.

15 Otros métodos comprenden el aplastamiento de células por medio de un paso de alta presión (20.000-30.000 psi o 140-210 MPa) a través de una válvula que tiene un orificio estrecho. Por lo tanto, el fluido se somete a fuertes fuerzas de cizallamiento con la consiguiente rotura de las células. La fuerza de cizallamiento para optimizar la rotura de la célula se define controlando la presión. El sistema requiere altas energías y un enfriamiento para las muestras que requieren múltiples pasos a través del sistema.

20 La homogeneización mecánica está incluida en estos métodos mecánicos, que funcionan bajo condiciones de alta presión y con el uso de una alta densidad de energía que se basa en el uso de presión y microválvulas para dividir las partículas hasta que se han reducido a dimensiones mínimas (por debajo de las micras). Las válvulas de homogeneización están dimensionadas para obtener el grado deseado de micronización y dispersión a la presión más baja posible, dependiendo de las diversas aplicaciones. Son máquinas industriales continuas que también pueden manejar caudales voluminosos con bajas energías específicas de uso (por ejemplo, una máquina que maneja flujos de líquido de 6 m<sup>3</sup>/h, con sobrepresiones de 1.500 bar (1,5 x 10<sup>5</sup> kPa), requiere una potencia igual a 315 kW).

30 Otro enfoque para la lisis térmica se describe en la bibliografía bajo el nombre de "tratamiento hidrotérmico" que se aplica experimentalmente para la lisis de algas, y se propone para la extracción de lípidos contenidos en semillas aceitosas. El proceso se proporciona con datos experimentales para la liberación de los lípidos contenidos en las algas. La operación consiste en un mecanismo de lisis térmico sobre una suspensión líquida-sólida bajo presión (200 atm; 2,026 10<sup>4</sup> kPa) y a una temperatura comprendida entre 250 y 300°C. La extracción final de los lípidos a partir de la masa celular lisada sólida se lleva a cabo con n-hexano. El enfoque tecnológico del problema desarrollado por esta última tecnología, así como los que utilizan sistemas de homogeneización presurizados, requieren aplicaciones industriales costosas, sobre todo para los materiales utilizados que deben garantizar la debida resistencia al sistema fisicoquímico compuesto por la suspensión a tratar bajo las condiciones del método de lisis ("Hydrothermal processing of high-lipid biomass to fuels" Johnson, Michael C, Ph.D. Instituto de Tecnología de Massachusetts - Departamento de Ingeniería Química, Instituto de Tecnología de Massachusetts, Fecha de Emisión: 2012).

40 La solicitud de patente internacional WO 99/15638 se refiere a un método para modificar la estructura de membranas lipídicas tales como capas bilipídicas de microorganismos, eucariotas o procariotas, liposomas, vesículas o células vivas. En particular, este método crea una inestabilidad (perturbación) de la estructura lipídica que permite la fusión de las membranas lipídicas sin lisar las células implicadas.

45 El método descrito en el documento WO 99/15638 proporciona el uso de un secador por pulverización a baja temperatura) para atomizar en pequeñas gotas un medio líquido tal como, por ejemplo, una solución fisiológica, leche, sangre, suero, caldos de fermentación y agua, que contiene la estructura lipídica, que se introducen a alta velocidad en un ambiente que contiene vapor a una temperatura controlada.

50 En el método del documento WO 99/15638, el medio líquido utilizado para suspender las células o estructuras lipídicas a fusionar durante la nebulización, favorece el proceso de fusión de las membranas celulares por lisis por parte de éstas. Por lo tanto, el medio líquido utilizado no debe favorecer la rotura de estas membranas sino su agregación. El objetivo del procedimiento del documento WO 99/15638 no es destruir las membranas de dos o más entidades celulares diferentes, sino mantener inalteradas las características de las células originales, permitiendo así una fusión parcial de las membranas celulares. De esta manera, el método produce agregados moleculares que combinan las características de las células agregadas en la mezcla multicelular.

55 En la lisis de una célula, se quiere recuperar el producto del proceso a partir de microorganismos sometidos a fermentación o cultivo, y una lisación o rotura debe efectuarse primero, por ejemplo térmicamente, en un volumen de proceso, o reactor, adecuado para obtener temperaturas superiores a 120°C, a una presión de al menos 5 bares, durante un tiempo comprendido entre 10 minutos y 4-5 horas bajo agitación moderada, es decir, las condiciones necesarias para la lisis de los microorganismos. Posteriormente, es necesario: iniciar el enfriamiento del reactor;

extraer la masa del reactor como una suspensión de residuos sólidos, aceites, agua y otros productos intracelulares; y finalmente se debe añadir un disolvente orgánico o inorgánico, o mezclas de los mismos, con el fin de obtener, con operaciones posteriores de solubilización y separación de los líquidos de los sólidos, el contenido de células producido por el proceso de fermentación o cultivo.

- 5 Este método se caracteriza porque más del 90% de las necesidades energéticas del proceso de extracción global del producto del proceso de fermentación se debe a la lisis térmica efectuada sobre los microorganismos fermentados.

10 El documento WO 2010/015398 describe la lisis celular de materiales de partida vegetales o animales mediante una combinación de un método de pulverización y descompresión para la extracción selectiva y separación de materiales intracelulares valiosos.

Por lo tanto, es de gran interés encontrar un nuevo método para obtener componentes intracelulares de materiales biológicos fermentados, en los que las necesidades de energía del método global son mucho menores que las de los procedimientos convencionales.

15 La presente invención se refiere a un método de lisis térmico para la recuperación (extracción) de componentes intracelulares de materiales de origen biológico, tales como levaduras cultivadas, algas, bacterias y/o mohos, o en particular productos fermentados, lo que permite que sean minimizados los costes operativos y los costes del equipo utilizado en el proceso de lisis de dichos procesos bioindustriales.

El método de la invención comprende:

20 - co-alimentación de al menos dos corrientes a un nebulizador, en el que la primera corriente comprende la suspensión acuosa de microorganismos celulares a lisar y la segunda corriente comprende un disolvente líquido o gaseoso (disolvente de nebulización);

25 - nebulización de la suspensión que contiene dichos microorganismos y su lisis de células térmica en un entorno caracterizado por una elevada superficie de intercambio y por lo tanto caracterizada por un bajo tiempo de contacto en un pequeño volumen o reactor de tratamiento, lo que normalmente conduce a un coste relativamente menor del equipo;

- separar los componentes intracelulares de los residuos celulares derivados de la lisis.

30 El líquido que acompaña a las células en la suspensión, o el disolvente de nebulización, es normalmente agua y/u otro compuesto químico que favorece el proceso de laceración de las membranas celulares para liberar el contenido de la célula. El disolvente utilizado debe, por tanto, favorecer la rotura de estas membranas y favorecer también la separación de los productos intracelulares de la matriz sólida restante. Ejemplos específicos de disolventes de nebulización son soluciones orgánicas, tales como, por ejemplo, hidrocarburos, alcoholes, ésteres, éteres. Cuando el disolvente de nebulización es una solución acuosa líquida, también pueden añadirse al mismo ácidos inorgánicos.

35 La nebulización de la suspensión de los microorganismos tiene lugar en una cámara de expansión (cámara de nebulización o unidad de lisis térmica) que contiene un gas inerte, vapor de agua, dióxido de carbono y/o un disolvente orgánico en fase gaseosa, a altas temperaturas. La cámara de nebulización puede estar ya a la temperatura de lisis, es decir, en el intervalo de 120°C a 180°C, preferiblemente de 120°C a 160°C e incluso más preferiblemente de 130°C a 150°C.

La ventaja de la presente invención es, de hecho, que es posible operar a temperaturas más bajas con respecto a las normalmente usadas en los procesos de lisis conocidos en la técnica.

40 La interacción con una superficie de contacto elevada, creada gracias a la nebulización, permite una rápida transferencia de energía cinética a la suspensión nebulizada, lo que provoca la rotura mecánica de la pared celular y/o membranas celulares de los microorganismos presentes en las gotas nebulizadas, por expansión. De este modo se obtiene la liberación de los contenidos intracelulares producidos por cultivo o, en particular, por fermentación, los cuales pueden recuperarse a lo largo de las unidades de proceso que siguen a la unidad de lisis térmica.

45 Las unidades de proceso subsiguientes están presentes después de la primera cámara de nebulización, tales como, por ejemplo, tanques de acumulación, ciclones o condensadores superficiales que se mantienen a una temperatura progresivamente decreciente y a lo largo de los cuales se observa la separación de una suspensión multifásica compuesta por los contenidos intracelulares, sólidos (restos celulares), un líquido acuoso y aceitoso debido a la condensación de parte de los vapores atmosféricos de la cámara de nebulización, este último debido a los disolventes que se co-alimentan junto con la suspensión de células y contenidos intracelulares o lípidos.

50 La fase acuosa contiene: agua, residuos del caldo de cultivo o de fermentación, sales, disolventes y algunos lípidos solubilizados. La fase lipídica o aceitosa contiene: disolventes orgánicos, ácidos grasos, lípidos, agua y sus sales. La fase sólida comprende los residuos sólidos que quedan de los agregados celulares (restos celulares) que pueden todavía contener lípidos no extraídos y que pueden someterse opcionalmente a una o más operaciones de lisis

adicionales mediante operaciones de nebulización subsiguientes y lisis de terminación en el mismo equipo, mediante el reciclaje junto con la alimentación primaria, a la cabeza de la cámara de nebulización, o en una unidad de lisis posterior.

5 La suspensión multifásica, producida en la cámara de nebulización, se somete entonces a separación gravimétrica o centrifugación, con el fin de separar el agua y los sólidos de la fase aceitosa que contiene los disolventes y los lípidos. La naturaleza del disolvente (disolvente de nebulización inicial) usado también influye en esta operación ya que puede crear fases en forma de suspensiones espumosas que son difíciles de tratar. Por lo tanto, la elección del disolvente de nebulización debe favorecer también la separabilidad de los componentes de la suspensión obtenida después de la lisis.

10 Una etapa de recuperación del disolvente de nebulización está siempre presente aguas abajo de la etapa de separación de las fases sólidas de las fases líquidas, análogamente a procesos químicos de extracción con disolvente.

Los lípidos recuperados pueden utilizarse como tales o enviarse al tratamiento destinado al uso final del mismo, por ejemplo dentro del rango de uso como biocombustibles, tratamiento de hidrogenación o transesterificación.

15 Los contenidos intracelulares de interés se separan del disolvente/fase acuosa por medio de separación gravimétrica o centrifugación. Al final del tren de separación, el agua puede permanecer parcialmente en forma de vapor y parcialmente en forma condensada. El agua siempre está presente, ya que deriva del agua presente inicialmente dentro de las células.

20 En particular, el método de la invención puede utilizarse en procesos de producción de lípidos obtenidos como compuestos intracelulares en levaduras cultivadas sobre sustratos de azúcar. Estos organismos celulares, tales como, por ejemplo, las levaduras *Lypomyces*, *Rhodotorula* y *Cryptococcus*, tienen una pared celular que es particularmente resistente también a las acciones de fuertes tensiones mecánicas/térmicas correspondientes a una presión incluso superior a 1000 bar ( $1 \times 10^5$  kPa).

25 La acción de la nebulización reduce los requerimientos de energía del proceso global, ya que el intercambio de calor sobre la base del proceso de lisis está favorecido por la alta superficie de intercambio térmico que se forma con los fenómenos de nebulización y cavitación inducidos por los altos perfiles térmicos a través de la célula.

30 El ambiente creado por la nebulización se caracteriza, de hecho, por una alta transferencia de energía en la interfase celular, ya que se observa un aumento en el intercambio de calor entre la fase gaseosa y la fase líquida. El intercambio de calor entre la fase gaseosa y la fase líquida se debe al hecho de que la interfase entre las dos fases es mayor, cuanto menor es el diámetro de las gotas de suspensión líquido-sólido y la velocidad de transferencia de la energía a través de las membranas celulares aumenta considerablemente en relación con un aumento en la superficie de contacto de la atmósfera líquido/gaseoso que es inversamente proporcional al diámetro de la gota y que, por lo tanto, aumenta su eficacia en aproximadamente tres unidades de medida con respecto a los casos de evaporación del líquido desde una superficie de separación gravitacional. Los valores típicos del coeficiente de intercambio de calor convectivo liminal,  $h$ , para el agua y el aire son:  $h = 10\text{-}100 \text{ W/m}^2\text{K}$ ; Agua = 500 - 10.000  $\text{W/m}^2\text{K}$ .

40 Los disolventes utilizados para la nebulización y posterior extracción de los componentes intracelulares de levaduras, algas, bacterias y/o mohos son disolventes orgánicos polares, tales como alcoholes, ésteres, cetonas, en particular metanol, etanol, isopropanol y/o acetato de etilo; se prefieren disolventes orgánicos apolares tales como alcanos, en particular hexano y/o isooctano, cortes de refinería caracterizados por una curva de ebullición normal que oscila entre 50°C y 180°C, preferiblemente 100°C, éter de petróleo, naftas y/o gasolinas alquiladas, o mezclas de los disolventes antes mencionados.

45 La cámara de nebulización, en la que se efectúa la suspensión que contiene los microorganismos, puede contener un gas inerte tal como, por ejemplo, nitrógeno, helio, argón, dióxido de carbono, además de vapor de agua o vapores saturados o sobrecalentados de los disolventes orgánicos indicados anteriormente como disolventes de nebulización. Esto permite tanto la lisis del microorganismo como la extracción en el disolvente de los componentes intracelulares de interés.

50 La extracción de los líquidos intracelulares de la matriz sólida del microorganismo es favorecida por el disolvente presurizado. La extracción se mejora entonces mediante una acción centrífuga que favorece la extracción para diferentes densidades de las fases sólida y líquida de la suspensión formada.

Para obtener la lisis térmica, la temperatura en la cámara de nebulización está dentro del intervalo de 90°C a 180°C, preferiblemente de 120°C a 160°C y aún más preferiblemente de 130°C a 150°C.

En particular, este último intervalo es preferido para las levaduras, en particular las levaduras *Lypomyces*, *Rhodotorula* y *Cryptococcus*.

La mezcla del disolvente de nebulización con la suspensión celular antes de la nebulización podría mejorar el rendimiento global del proceso de lisis, ya que podría actuar químicamente sobre la capa bilipídica que forma la membrana celular, como se observa en las soluciones técnicas de la técnica anterior. En la técnica, de hecho, un tiempo de contacto prolongado entre el disolvente y las células a lisar es un factor importante, junto con la temperatura y presión para obtener la lisis de los microorganismos.

Sin embargo, este tiempo de contacto prolongado representa un coste energético adicional, mientras que la presente invención pretende reducir estos costes y, por lo tanto, se caracteriza por tiempos de residencia de contacto reducidos del disolvente con las células a lisar, tanto cuando el disolvente se pone en contacto con las células antes de ser introducidas en el nebulizador como también cuando el disolvente está presente en la cámara de nebulización donde se ha nebulizado la suspensión de microorganismos a los que no se ha añadido previamente el disolvente.

El dimensionamiento del volumen de nebulización para el método en la base de la presente invención surge de la aplicación del concepto de separación de la suspensión que contiene las fases sólido-líquido, derivadas de la acción de lisis celular, de los vapores liberados después de la nebulización. Este concepto contempla también el uso, a veces necesario, de varias cámaras de separación, dispuestas en serie con respecto al flujo de gas, que son necesarias para favorecer la separación de los contenidos celulares además de los residuos sólidos de la célula lisada.

La forma de la cámara de nebulización debe favorecer la separación de los vapores de la suspensión y la salida y recogida de estos desde el fondo de la misma. Las formas cilíndricas, también intercaladas por reductores de velocidad con rejilla o laminar, con un terminal troncocónico para recoger las suspensiones, son formas preferidas de la cámara de nebulización.

Una situación en la que existe un perfil térmico creciente entre la primera cámara y las cámaras subsiguientes, no influye en la acción de lisis, cuando estas temperaturas están por debajo de los valores de temperatura y presión previstos por el método. En general se puede decir que temperaturas más altas en las cámaras que siguen a la cámara de nebulización pueden ser contraproducentes en términos de efectos químicos sobre los líquidos lisados.

El perfil térmico, a lo largo de la línea de proceso que parte del volumen de nebulización, que se define por el intercambio térmico efectuado en la pared o mediante insertos de intercambio en los volúmenes separadores, influye generalmente, por otra parte, en la liberación de disolventes de la suspensión que se deriva de la lisis. Este perfil se define por el caudal de los gases liberados y el arrastre permitido de los contenidos celulares debido al equilibrio físico-químico líquido/vapor y a la acción de las velocidades del gas.

La cámara de nebulización puede ya estar a la temperatura de lisis o a temperaturas más altas para favorecer altos índices de flujo de tratamiento en la lisis y contiene los gases o vapores antes mencionados a una temperatura igual o superior a la temperatura a la que la lisis y la extracción se efectúan.

La suspensión que contiene los microorganismos a lisar puede entrar en la cámara de nebulización a una temperatura más baja que aquella en la que se va a realizar la lisis. En este caso, el disolvente entra con un caudal y un nivel térmico que son tales que alcanzan, junto con la sustancia a lisar, las condiciones de lisis en el nebulizador.

Parte del agua de la célula endo/exo presente y parte, o todo, el disolvente posiblemente alimentado con la suspensión de microorganismos, se evapora en la cámara de nebulización, disminuyendo la temperatura que estaba presente en la cámara de nebulización antes de alimentar la suspensión de microorganismos, liberando líquidos de alto punto de ebullición tales como lípidos intracelulares, que están separados en las paredes de la cámara junto con los restos celulares.

Un posible aumento de la temperatura en los volúmenes de separación, posterior a la cámara de nebulización, tiene un efecto negativo sobre los lípidos, aumentando la cuota de ácidos grasos contenidos en la suspensión. Sin embargo, este aumento puede favorecer la extracción de la matriz sólida.

Después de la lisis, los componentes intracelulares de interés de naturaleza lipídica, tales como triglicéridos, ácidos grasos mono y diacilglicéridos, fosfolípidos, fitoles, colesterolos, se liberan en una suspensión de aceites de alto punto de ebullición (los lípidos tienen un punto de ebullición a temperatura ambiente más alto que 300°C) junto con los residuos de células sólidas. La suspensión de los aceites de alto punto de ebullición se separa entonces del disolvente de nebulización, si éste puede separarse de dichos aceites, tal como, por ejemplo, cuando el disolvente es acuoso o polar, y se envía a la separación de los residuos de células sólidas (residuos); como ya se ha señalado anteriormente, esta separación puede efectuarse gravimétricamente, por densidad, centrifugación o filtración, por ejemplo con un hidrociclón, decantador o tricantador o por destilación, por medio de membranas o por evaporación del producto del disolvente de nebulización/extracción.

El agua presente en la cámara de expansión, de origen intracelular o derivada de la suspensión de células o del vapor a alta temperatura posiblemente añadido para fines de intercambio térmico, conjuntamente o por separado con la suspensión a lisar, se retira preferiblemente de la suspensión para facilitar la subsiguiente separación sólido/líquido, evitando espumas y suspensiones que interactúan negativamente en la subsiguiente separación de

los productos celulares. El disolvente de nebulización se alimenta opcionalmente junto con vapor de agua presurizado con el fin de controlar la temperatura de lisis en el nebulizador. Esta metodología operativa se utiliza si hay una fácil separación agua/disolvente en fase líquida. En estos casos, el vapor, que contiene el disolvente y el agua, se envía a una segunda cámara y una vez separado del agua, se recicla al nebulizador, donde se integra con un disolvente nuevo.

El equipo que puede utilizarse para la nebulización es básicamente análogo o igual al utilizado para la operación de nebulización de una suspensión líquida de un sólido (secador por pulverización). Un secador por pulverización es una combinación de aparatos compuestos por una bomba de alimentación de un líquido que contiene una suspensión, un sólido inorgánico o no, una fuente de gas o vapor tal como un portador de energía térmica y mecánica, un atomizador, un calentador, un espacio de dispersión de la mezcla vapor/líquido/sólido que sale del atomizador, o cámara de secado, además de sistemas de tratamiento/condensación de la mezcla de vapor/gases de escape y recuperación de posibles polvos. El compuesto sólido se extrae en seco a la temperatura de la cámara de secado.

Teniendo en cuenta las condiciones necesarias para la lisis térmica del microorganismo y las condiciones de extracción del producto a partir de la sustancia celular en la que se retiene, se pueden especificar una serie de condiciones de funcionamiento para la lisis y recuperación del lípido sólido, líquido o solubilizado en el disolvente, si se utiliza.

Los materiales que se utilizarán para las aplicaciones de lisis deberán definirse en relación con las condiciones de funcionamiento, es decir, en relación con la temperatura y presión nominales de funcionamiento, y con respecto a la resistencia a las condiciones de agresividad del medio ambiente a su vez en relación con los disolventes y contenidos en los líquidos que acompañan a las células.

El método de aplicación, objeto de la presente solicitud de patente, permite ahorros considerables en los costes variables y CAPEX (gastos de capital) de las plantas para efectuar las operaciones de lisis de células y la extracción de los compuestos intracelulares, debido a que, gracias al método de la invención, existe un ahorro de energía significativo, ya que ya no son necesarios aparatos para la lisis térmica o mecánica de las células en una primera fase con unidades de extracción costosas posteriores de los lípidos.

#### Breve descripción de las figuras

Figura 1: La figura 1 muestra el rendimiento de extracción (dw%) de los lípidos con respecto al peso seco, en relación con la temperatura de nebulización de las suspensiones de las levaduras *Lypomyces* (L), *Rhodotorula* (R) y *Cryptococcus* (C).

Figura 2: La figura 2 muestra la comparación entre termogramas de células de levadura de *Lypomyces* después de la nebulización pero antes de la extracción con disolvente de los lípidos contenidos en la misma, a temperaturas de nebulización crecientes.

Figura 3: la figura 3 muestra el termograma de células de levadura de *Lypomyces* secadas en un horno a 105°C; se puede observar la curva en % en peso restante (escala izquierda) y las curvas derivadas (D%/DT).

Figura 4: La figura 4 muestra el espectro IR de la trioleína (figura 4a) y el extracto SOX107 (a 150°C) (figura 4b).

Figura 5: en la figura 5, se representa el esquema de planta de una solución de ciclo cerrado, para implementar el método de la invención.

Figura 6: en la figura 6 se ilustra la tabla 4, que indica el balance de material y energía del ejemplo relativo de una *Rhodotorula* tratada mediante fermentación de azúcar.

#### Ejemplos

##### Ejemplo 1

Se utilizaron tres suspensiones de levaduras en agua del tipo *Lypomyces*, *Rhodotorula* o *Cryptococcus* (biomasa) para la recuperación de los componentes intracelulares de acuerdo con el método de la invención. No se añadieron otros disolventes a la suspensión en la fase de nebulización.

En el presente ejemplo, el objetivo es únicamente definir la capacidad de lisis del proceso propuesto. La lisis eficaz se evalúa posteriormente a posteriori con análisis clásicos por medio de una unidad de extracción líquido-sólido Soxhlet.

Para la nebulización de la suspensión se utilizó un secador por pulverización MINI 190 del proveedor BUCHI que, como secador, era capaz de evaporar aproximadamente 100-500 g/h de agua con un flujo de N<sub>2</sub> de 700-1.000 NI/h que se puede calentar a una temperatura máxima de 250°C, y que es, por lo tanto, capaz de producir aproximadamente 1-100 g/h de polvo seco que tiene un tamaño de partícula del orden de 0,2 a 10 micrómetros.

El tiempo total utilizado por la biomasa para seguir la "parte caliente" del circuito hasta la boquilla de nebulización, fue de 10-30 segundos. Todo el circuito de gas alimentado a la cámara de nebulización hasta la cámara de nebulización o pulverización está bajo un ligero vacío, precisamente 0,97 atm (9828 kPa).

5 El nitrógeno estaba presente como gas inerte en la cámara de nebulización en la que se pulverizó la suspensión a tratar, cuya temperatura se mantuvo aproximadamente al mismo valor que en la entrada del separador de ciclón (temperatura a la cual se lleva inmediatamente la muestra después de la boquilla por evaporación del agua de suspensión y que se monitorizó constantemente como se indica en la Tabla 1).

10 Se utilizó una unidad Soxhlet para la extracción de los lípidos de los sólidos celulares. Se lavó un cartucho de papel con el disolvente de extracción y después se llevó a un peso constante en un horno a 105°C. El sólido a tratar (3-20 g) se cargó en el cartucho. El disolvente de extracción (150-200 ml) se cargó en el matraz, cuya tara-peso se había determinado con precisión. En los ejemplos de los casos descritos en las Tablas 1 y 2 se utilizaron los siguientes productos: hexano, caracterizado por un punto de ebullición de 69°C y una densidad de 0,655 g/ml, índice de polaridad 2, acetato de etilo, caracterizado por un punto de ebullición de 77°C y una densidad de 0,90 g/ml, etanol, caracterizado por un punto de ebullición de 79°C y una densidad de 0,789 g/ml, índice de polaridad 24. Las calderas se introdujeron en el matraz y el matraz se calentó con un baño de aceite. El disolvente se re-condensó con un condensador de agua en la parte superior del Soxhlet. Al final del último ciclo se efectuaron unos 10 ciclos de extracción, se retiró el cartucho y se colocó en un horno a 105°C hasta que se obtuvo un peso constante.

20 Con el fin de separar el disolvente de extracción del extracto lipídico, el Soxhlet se sustituyó con un clisé, y el disolvente se destiló, primero a presión atmosférica y después bajo vacío a aproximadamente 0,005 atm absolutas (506 Pa). El extracto de lípido permanece en el matraz.

Se utilizó un microscopio óptico para determinar la morfología de las partículas antes y después de la operación de nebulización y se utilizó una termobalanza (Perkin Elmer) para caracterizar el grado de humedad y el contenido de cenizas de los polvos obtenidos.

25 Se realizaron análisis espectrofotométricos de transformada de Fourier (FT-IR) para caracterizar el extracto lipídico. Los extractos se caracterizaron por medio del análisis FT-IR (Nicolet Nexus 670) dentro del intervalo de 4.000 - 1.000 cm<sup>-1</sup> (a 2 cm<sup>-1</sup>) en transmisión por moldeo del extracto como tal sobre una tableta de CaF<sub>2</sub>.

Las nebulizaciones indicadas en la Tabla 1 siguiente se efectuaron usando el método descrito anteriormente.

30 El ensayo SD100 se llevó a cabo con una alimentación diluida de aproximadamente 1:3 en H<sub>2</sub>O desmineralizada con respecto a los otros. Los tres ensayos difieren en la temperatura de la cámara de nebulización (T fuera en la Tabla 1 a continuación) y en particular 95°, 130° y 150°C. Debe observarse que el *Cryptococcus* utilizado para el ensayo SD104, indicado en la tabla, antes del secado en el secador por pulverización, se sometió a diafiltración con la adición de agua desmineralizada y ultrafiltración para separar/recoger las células de levadura y dejar los azúcares presentes inicialmente con la levadura en agua, con el fin de eliminar la glucosa residual de la fermentación.

Tabla 1 - condiciones de nebulización.

Prueba	Suspensión		
		Peso (g)	Peso seco (dw%)
SD100	<i>Lypomyces</i>	150	9,8
SD101	<i>Lypomyces</i>	19	29,5
SD102	<i>Lypomyces</i>	67	29,5
SD103	<i>Rhodotorula</i>	26,8	13,0
SD104	<i>Cryptococcus</i>	127,2	4,2

35

# ES 2 627 948 T3

(Continuación de la tabla 1)

PRUEBA	CONDICIONES DE PULVERIZACIÓN						Recuento de estimación (dw%)
	nitrógeno (l/h)	Vacío atm	Punto de ajuste Bomba	T en (°C)	T fuera (°C)	f. peso (g)	
SD100	550	0,975	4	210	<b>95</b>	6,9	47%
SD101	550	0,975	3	220	<b>130</b>	3,8	67%
SD102	551	0,975	4	250	<b>150</b>	16,2	82%
SD103	551	0,975	3	250	<b>130</b>	2,5	73%
SD104	500	0,975	3	250	<b>150</b>		

Claves de la Tabla 1:

- 5 Prueba = código de prueba
- Peso (g) = cantidad de suspensión de levadura nebulizada
- Peso seco (dw%) = cantidad de levadura en la suspensión nebulizada
- Nitrógeno (l/h) = caudal en el gas caliente suministrado a la cámara de nebulización
- Vacío (atm) = presión absoluta del nitrógeno después del ciclón en el que la levadura seca se separa y recoge
- 10 Punto de ajuste bomba = selector del caudal de la bomba de alimentación de la suspensión de levadura en la cámara de nebulización
- (3 = bajo, 4 = medio, 5 = alto)
- T en (°C) = temperatura del nitrógeno en la entrada de la cámara de nebulización, por lo tanto, antes de la introducción de la suspensión a ser nebulizada
- 15 T fuera (°C) = temperatura de la cámara de nebulización después de la introducción de la suspensión de levadura
- f peso (g) = cantidad de levaduras secas recogidas en el ciclón situado después de la cámara de nebulización.
- Recuento de estimación (%) = peso de las levaduras recogidas en el ciclón con respecto a la cantidad de levaduras alimentadas en suspensión.
- 20 Las levaduras recogidas en el ciclón posicionado después de la cámara de nebulización resultan ser secas, ya que tienen un contenido de agua residual de menos del 5%. Estas levaduras secas se caracterizaron por medio de análisis termogravimétricos. La termogravimetría consiste en un registro de la evolución del peso en aire entre la temperatura ambiente y 930°C, con un gradiente de 10°C/min. Las muestras sometidas a termogravimetría son las enumeradas en la Tabla 2 a continuación.

Tabla 2

25 TERMOGRAVIMETRÍA

SD100

SD101

SD102

SD103

30 SD104

Ex 105°C en el horno

SOX104 Residuo de SD100 extraído con hexano de disolvente

SOX105 Residuo de SD101 extraído con etanol de disolvente

SOX107 Residuo de SD102 extraído con etanol de disolvente

SOX109 Residuo de SD103 extraído con acetato de etilo de disolvente

SOX110 Residuo de SD103 extraído con etanol de disolvente

5 SOX111 Residuo de SD104 extraído con acetato de etilo de disolvente

SOX112 Residuo de SD104 extraído con etanol de disolvente

10 La operación de nebulización normal del presente instrumento, utilizada como secador por pulverización hasta una temperatura de 95°C, produce un secado eficaz de la suspensión de estas levaduras (el agua residual en los sólidos es inferior al 5%), pero no es eficaz al mismo tiempo efectuando la lisis de la membrana celular. Sólo a partir de una temperatura más alta, en la que la muestra permanece durante unos 10-20 seg. a T mayor o igual a 120°C, fue un rendimiento significativo obtenido en términos de porcentaje de extracto, en el siguiente proceso de extracción efectuado en la unidad Soxhlet, que aumenta progresivamente con un aumento de la temperatura de nebulización.

15 En resumen, una correlación directa e inequívoca es evidente entre el aumento de la temperatura de nebulización y la lisis eficaz del microorganismo. Durante las pruebas de verificación de los lípidos extraídos, se demostró de hecho que el efecto de lisis aumentaba con el aumento de la temperatura del proceso de nebulización, debido al valor de la temperatura y a la rapidez del aumento de la temperatura en el pulverizador, lo que provoca la rotura de la membrana de muestra.

La Figura 1 indica el rendimiento de extracción (dw%) de los lípidos, en relación con la temperatura de nebulización de las suspensiones de las levaduras *Lypomyces* (L), *Rhodotorula* (R) y *Cryptococcus* (C).

20 Como puede observarse en la figura 1, el porcentaje del rendimiento de extracción, con el mismo disolvente usado, aumenta con un aumento en la temperatura de nebulización de los microorganismos.

La Figura 2 muestra los termogramas que indican los resultados obtenidos con el método de la invención.

25 En particular, la figura 2 muestra una comparación entre termogramas de células de levadura *Lypomyces* después de la nebulización a temperaturas de nebulización crecientes, es decir, a 95°C, 130°C y 150°C, pero antes de la extracción con disolvente de los lípidos contenidos en la misma.

Los termogramas de la figura 2 representan las curvas en % en peso residual (escala izquierda) y las curvas derivadas (D%/DT) obtenidas calentando las muestras nebulizadas en una atmósfera de aire con un perfil de calentamiento de 10°C/min a temperaturas de 95°C, 130°C y 150°C.

30 La temperatura a la que se observa la pérdida de peso principal en el termograma está dentro del intervalo de 280-380°C. Esta pérdida de peso indica la rotura de la membrana y se correlaciona, en el gráfico, con la temperatura a la que se ha nebulizado la muestra. En particular, se puede observar, a partir de esta comparación, que una temperatura de nebulización más alta de las suspensiones iniciales (como se indica en la Tabla 1, la muestra SD100 se nebulizó a 95°C (T fuera = 95°C), la muestra SD101 a 130°C y la muestra SD102 a 150°C) conduce a una temperatura más baja con respecto a la pérdida de peso (rotura de la membrana) de la muestra analizada.

35 Para fines comparativos, la Figura 3 muestra el termograma de una suspensión de levadura *Lypomyces* secada en un horno a 105°C, de la que se deduce que la pérdida de peso, es decir, la medición de una lisis hipotética debida únicamente al efecto de secado térmico, no tiene lugar a estas temperaturas que son las normalmente utilizadas en la tecnología de secado de un secador por pulverización. Sólo con temperaturas mucho más altas y tiempos de tratamiento más largos de unos pocos órdenes de magnitud con respecto a aproximadamente diez microsegundos, la lisis térmica puede conducir a la rotura de las membranas de la levadura usadas en el ejemplo de nebulización. Los termogramas de la Figura 2 también muestran cómo el contenido de humedad residual en las muestras producidas con nebulización fue inferior al 5% (pérdida de peso a una temperatura de 105°C, inferior al 5%) y cómo había un contenido de ceniza modesto, menor que 4% (peso residual a una temperatura de 600°C). El comienzo de los fenómenos de degradación significativos se indica por la pérdida de peso que se observa a aproximadamente 45 220°C.

La pérdida de peso entre 280°C y 380°C comienza a temperaturas más bajas con un aumento en la temperatura de nebulización de la muestra, lo que indica una mayor facilidad en la liberación de las sustancias endocelulares hacia el medio exterior. Las otras pérdidas de peso observadas, en particular a aproximadamente 250°C, 420°C y 500°C, que son otros componentes celulares, como, por ejemplo, hidratos de carbono, no parecen estar influidas, por el contrario, por el tratamiento de nebulización al que se sometió la muestra. 50

La Figura 4 muestra la curva del espectro IR del extracto SOX107 (a 150°C) (figura 4b) (de nuevo con referencia a las muestras indicadas en las Tablas 1 y 2), y para la comparación directa, el espectro IR de un triglicérido de referencia, es decir, con trioleína (figura 4a). A partir de una comparación, se puede deducir que los espectros

obtenidos con el método de la invención son los de triglicéridos, con la banda característica de carbonilo a  $1750\text{ cm}^{-1}$ . También existe la presencia de ácidos grasos libres (banda a  $1705\text{ cm}^{-1}$ ) que se derivan de la hidrólisis de los lípidos (triglicéridos).

Ejemplo 2

- 5 A continuación se ilustra un esquema de planta para el uso del método de la invención, en el que se extrajeron los lípidos contenidos en una levadura de la familia Rhodotorula.

En el presente ejemplo, la sustancia a lisar, en suspensión en el agua de fermentación, se trata en lisis junto con n-hexano como disolvente, necesario para la extracción de los lípidos del sólido.

- 10 La figura 5 representa el esquema de la planta de una solución de ciclo cerrado en la que la nebulización se obtiene con un secador por aspersion industrial usual, en el que las especificaciones de las operaciones están en línea con los datos enumerados en el ejemplo 1 y varían de acuerdo con el producto a ser lisado, en relación con las condiciones de temperatura y el disolvente utilizado. Una amplia gama de cámaras de nebulización y sistemas de inyección en línea con la tecnología específica de secado por pulverización están disponibles en el catálogo.

La Tabla 3 a continuación proporciona una clave de los símbolos del esquema de planta de la figura 5:

- 15 Tabla 3:

E-100	Intercambiadores de calor de haz de tubos	
E-101		
q100	Energía suministrada para el calentamiento por medio de un fluido de servicio externo	
VLV-100	Válvula de laminación	
MIX-101	Pulverizador o nebulizador	
V-100	Cámara de nebulización	
E-102	Intercambiador de calor con vapor de pared de V-100	
C-500-2	Columna para separación agua-disolvente	
X-100	Separador de lípidos aceite-sólido	
MIX-102	Proceso de relleno del disolvente	
P-100	Bomba de arrastre de disolventes	
RCY-2	Reciclaje	

- 20 El esquema representado en la figura 5 está compuesto por una bomba P-100 que lleva un disolvente para la extracción del producto intracelular, bajo presión a un valor adecuado para el intercambio térmico y la operación de lisis en la cámara de nebulización. En este caso, debe obtenerse una temperatura específica para la rotura celular del microorganismo y un tiempo de residencia de la suspensión nebulizada dentro del intervalo de 5-300 segundos, preferiblemente aproximadamente 10 segundos.

El líquido (flujo "12") pasa a través de un intercambiador sin cambiar la fase, y luego entra en un mezclador de rejilla estática donde se encuentra la suspensión o la solución turbia a lisar (flujo "1") y la arrastra a un secador por pulverización (nebulizador).

- 25 El mecanismo de mezcla radial turbulento en el mezclador reduce las velocidades radiales y las dimensiones de los agregados monofásicos a mezclar, aumentando la superficie de contacto y estimulando el intercambio de la concentración térmica y química, mejorando la mezcla. La longitud de los dispersores necesarios depende del tiempo de contacto requerido. Para procesos de transferencia de masa en los que el equilibrio se establece rápidamente, generalmente una longitud de 5 diámetros es suficiente.

- 30 Existe un vasto estado de la técnica sobre diversos tipos de nebulizadores neumáticos para aplicaciones que se pueden usar de acuerdo con las características de concentración y/o viscosidad de la alimentación. Se pueden mencionar, por ejemplo:

- Nebulizadores de tubo concéntrico

- Nebulizadores de flujo cruzado
- DIN (Nebulizador de Inyección Directa)
- Nebulizadores de discos perforados
- Nebulizadores Babington en las versiones "V-groove" y "cone-spray"

5 - Nebulizadores de "vía paralela".

En los sistemas industriales, la nebulización de los productos se efectúa con diversos secadores por pulverización, bajo condiciones de temperatura y flujo de aire controlados, que pueden girar para una homogeneización mejorada de la cámara V-100.

10 El líquido, o gas licuado para las condiciones operativas, introducido en el mezclador, sale de una boquilla y es dispersado por un difusor en forma de aerosol. La suspensión se divide en gotas nebulizadas que luego entran en contacto con vapor de agua en el presente ejemplo para el control de la temperatura de la cámara de nebulización V-100 y se expande. La temperatura de esta cámara se mantiene por encima del umbral de lisis por un flujo de vapor adicional y de pared.

15 La evaporación de parte o de todo el disolvente líquido y agua que acompaña al producto a lisar, libera las células en una suspensión de aceites de alto punto de ebullición (como ya se ha indicado, los lípidos tienen un punto de ebullición normal superior a 300°C).

20 Los vapores evacuan la cámara V-100 bajo condiciones de temperatura y flujo controladas. La suspensión de residuos sólidos y lípidos es descargada continuamente, por gravedad y presión, desde la cámara de nebulización, y puede ser enviada a la separación de los residuos celulares (este es el flujo indicado con "4" en el esquema de la figura 5). El flujo "2" representa un flujo de vapor de agua para el control de temperatura de la cámara de nebulización.

Después de enfriar hasta por debajo de 100°C, los vapores se envían a una columna de recuperación del disolvente, C-100, que se recicla luego junto con un flujo de preparación a la bomba P-100.

El agua separada (corrientes "6" y "7") es enviada a una planta de tratamiento antes de ser desechada.

25 La Tabla 4 proporcionada en la figura 6, indica el balance de material y energético del ejemplo relativo a una *Rhodotorula* tratada mediante fermentación de azúcar.

30 El esquema se desarrolló para una concentración de sólidos a lisar al 30% en peso en la solución turbia a tratar. Las condiciones de especificación para la operación de lisis se indican en la Tabla 4. A este respecto, se necesitan 1,52 kg de vapor a 30 bar ( $3 \times 10^5$  Pa) y 21 kg de agua de refrigeración por kg de solución turbia a lisar. Los otros intercambios se compensan internamente.

La operación de extracción se efectúa luego sobre un tridecantador usando hexano.

Si la alimentación, resultante de una filtración, se relaciona con una solución turbia a un 70% en peso de microorganismos, los consumos característicos bajarían a un muy conveniente 0,37 kg de vapor y 4,25 kg de agua de torre por kg de solución turbia a lisar.

35

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para recuperar componentes intracelulares a partir de una suspensión de microorganismos, que comprende:
  - 5           - co-alimentar al menos dos corrientes a un nebulizador, en el que la primera corriente comprende la suspensión acuosa de microorganismos celulares a lisar y la segunda corriente comprende un disolvente líquido o gaseoso;
  - nebulizar dicha suspensión en una cámara de nebulización mantenida a una temperatura comprendida entre 120°C y 180°C, para obtener la lisis de las paredes celulares de los microorganismos con la formación de una suspensión que contiene los componentes intracelulares y residuos celulares derivados de la lisis, y una fase de vapor que comprende el disolvente orgánico;
  - 10           - separar los componentes intracelulares de los residuos celulares derivados de la lisis.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el disolvente es un disolvente orgánico polar.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el disolvente orgánico polar se selecciona entre alcoholes, ésteres, cetonas o mezclas de los mismos.
- 15    4. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el disolvente orgánico polar se selecciona entre metanol, etanol, isopropanol y/o acetato de etilo.
5. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el disolvente es un disolvente orgánico apolar.
6. El método de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el disolvente orgánico apolar es un alcano.
7. El método de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el disolvente orgánico apolar se selecciona entre hexano y/o isooctano, cortes de refinería caracterizados por una curva de ebullición normal que oscila entre 50°C y 180°C, preferiblemente 100°C, éter de petróleo, naftas y/o gasolinas alquiladas, o mezclas de los mismos.
8. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la nebulización de la suspensión de los microorganismos cultivados tiene lugar en una cámara de nebulización que contiene un gas inerte, seleccionado entre vapor de agua, dióxido de carbono o el disolvente de nebulización en fase gaseosa.
- 25    9. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la temperatura de la cámara de nebulización oscila entre 120°C y 160°C, preferiblemente entre 130°C y 150°C.
10. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que los microorganismos son levaduras, algas, bacterias y/o mohos.
11. El método de acuerdo con la reivindicación 10, en el que los microorganismos cultivados son levaduras, seleccionadas entre:
  - 30           Lypomices, Rhodotorula y Cryptococcus.
12. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que los componentes intracelulares son lípidos intracelulares producidos por los microorganismos cultivados después de la fermentación del azúcar.
13. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la separación de los componentes intracelulares de los residuos celulares derivados de la lisis se efectúa gravimétricamente o por centrifugación.
- 35    14. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la suspensión que contiene los componentes intracelulares y residuos celulares derivados de la lisis se somete a al menos una operación de lisis adicional reciclando la misma suspensión.
15. El método de acuerdo con la reivindicación 14, en el que el reciclado de la suspensión que contiene los componentes intracelulares y residuos celulares derivados de la lisis se efectúa junto con la suspensión inicial a lisar, aguas arriba de la cámara de nebulización.
- 40    16. El método de acuerdo con la reivindicación 14, en el que el reciclado de la suspensión que contiene los componentes intracelulares y los residuos celulares derivados de la lisis se efectúa hacia una unidad de lisis corriente abajo de la cámara de nebulización.

45

Fig. 1

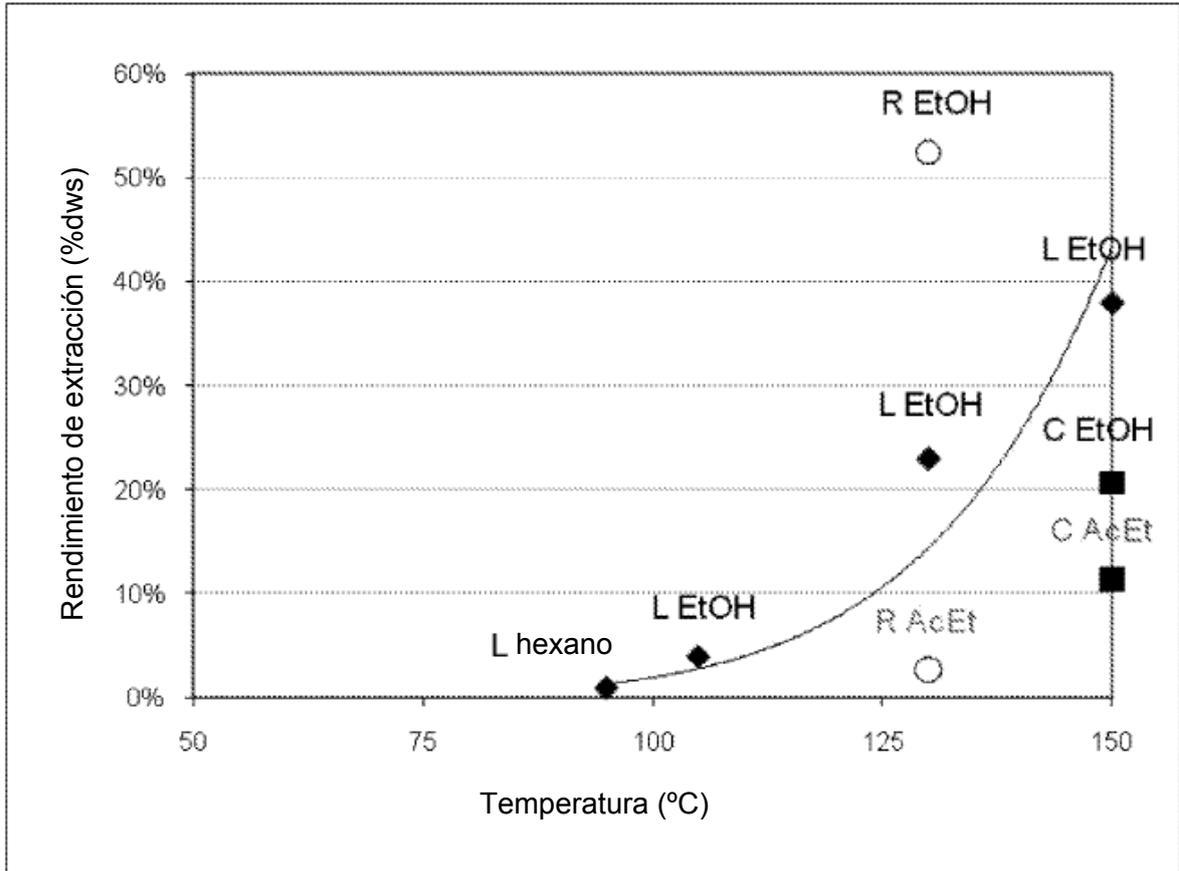


Fig. 2

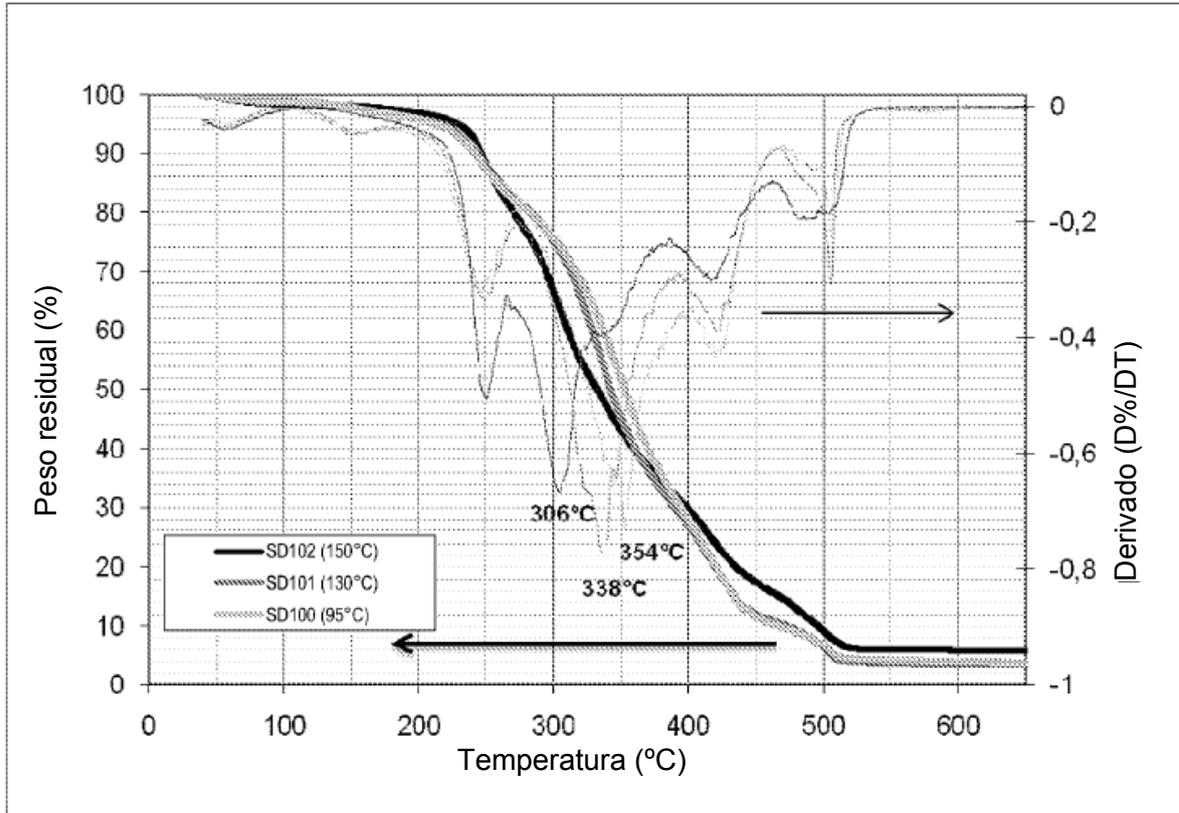


Fig. 3

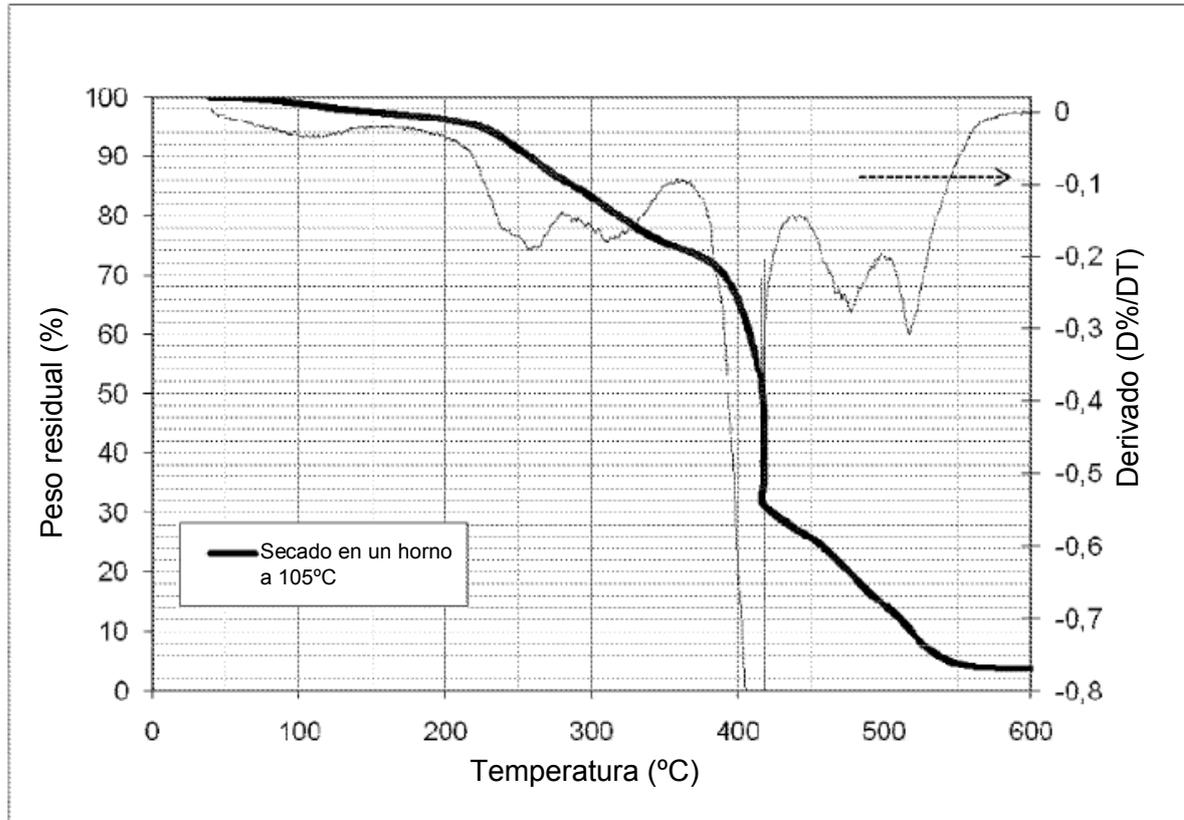


Fig. 4

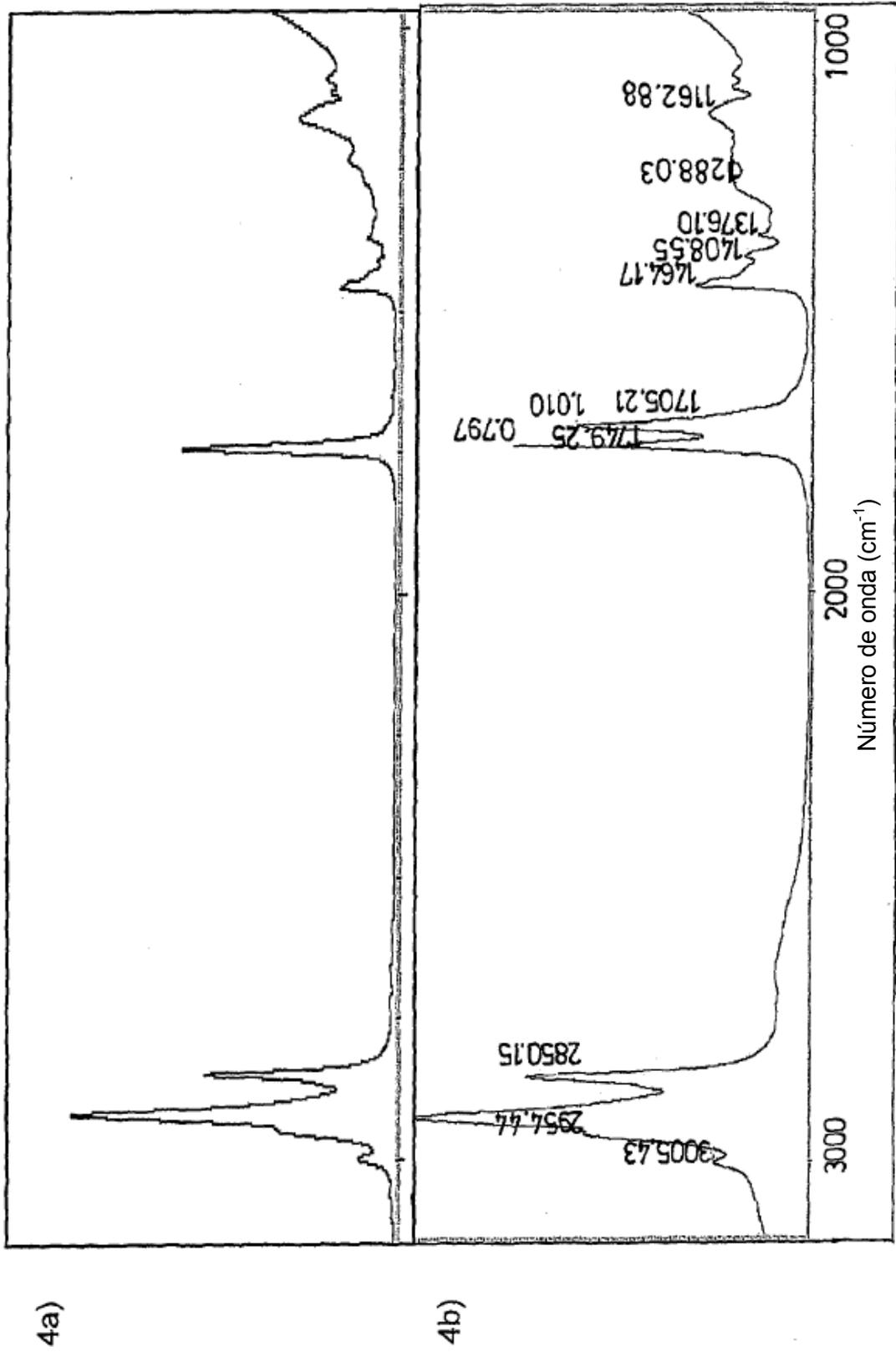


Fig. 5

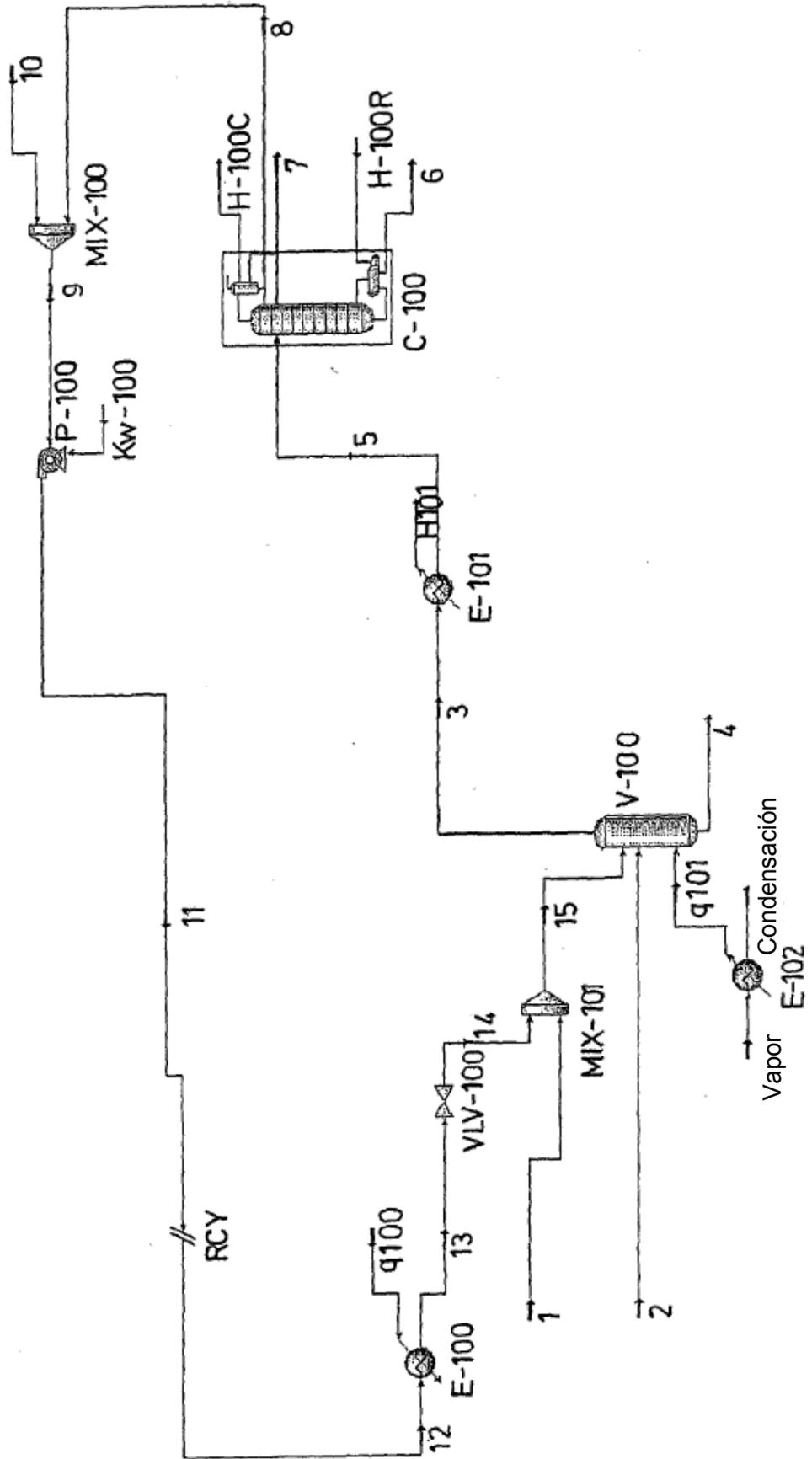


Fig. 6

Corriente	1	12	13	15	2	4
Fracción de vapor	0.0	0.0	0.0	0.1	1.0	0.0
Temperatura (°C)	40.0	35.0	190.0	61.8	233.8	150.0
Presión (bar)	1.00	20.00	20.00	1.00	30.00	1.00
Caudal de masa [kg/h]	1.0	0.7	0.7	1.7	0.3	0.3
Caudal volumétrico [m <sup>3</sup> /h]	1.01	0.99	0.99	2.00	1.37	0.31
Flujo de calor [kg/h]	-6.65E+03	-3.91E+02	-3.24E+02	-6.98E+03	-4.29E+03	-8.60E+01
Fracción en peso sólida	10.2%					34.6%
Densidad [kg/m <sup>3</sup> ]	1104.3	650.6	460.8	6.2%	12.8	976.1
Fraciones en peso						
Agua	0.6915	0.0008	0.0008	0.4183	1.0000	0.0001
Azúcares	0.0027	0.0000	0.0000	0.0016	0.0000	0.0092
n-hexano	0.0000	0.9981	0.9981	0.3948	0.0000	0.0006
Rhodotorula	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Restos celulares	0.0000	0.0000	0.0000	0.0618	0.0000	0.3465
Lípidos	0.0000	0.0000	0.0000	0.1196	0.0000	0.6433
Otros productos	0.3058	0.0010	0.0010	0.0038	0.0000	0.0003

Tabla 4

Fig. 6 (continuación)

Corriente	3	5	8	6	11	7	10	9
Fración de vapor	1.0	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Temperatura (°C)	150.0	80.0	32.2	90.5	33.7	32.2	20.0	32.0
Presión (bar)	1.00	1.00	0.90	1.00	20.00	0.90	1.00	0.90
Caudal de masa [kg/h]	1.6	1.6	0.6	0.9	0.7	0.0	0.0	0.7
Caudal volumétrico [m <sup>3</sup> /h]	1.95	1.95	0.98	0.94	0.99	0.04	0.01	0.99
Flujo de calor [kg/h]	-7.22E+03	-7.74E+03	-3.88E+02	-7.17E+03	-3.91E+02	-3.04E+02	-4.22E+00	-3.92E+02
Fración en peso sólida	0.0%							
Densidad [kg/m <sup>3</sup> ]	0.8	3.9	651.0	952.4	651.8	991.4	661.7	651.1
Fraciones en peso					0	0	0	0
Agua	0.5875	0.5875	0.0008	0.9788	0.0008	0.9662	0.0000	0.0008
Azúcares	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
n-hexano	0.4038	0.4038	0.9981	0.0070	0.9981	0.0288	1.0000	0.9981
Rhodotorula	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Restos celulares	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Lípidos	0.0049	0.0049	0.0000	0.0084	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Otros productos	0.0038	0.0038	0.0011	0.0057	0.0011	0.0050	0.0000	0.0011

Tabla 4