

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 730 004**

51 Int. Cl.:

A23N 1/00 (2006.01)

C12M 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.01.2007** **E 07000218 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2019** **EP 1825765**

54 Título: **Procedimiento para la disgregación de material biológico así como dispositivo para su realización**

30 Prioridad:

24.02.2006 DE 102006009157

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

07.11.2019

73 Titular/es:

**EISENMANN SE (100.0%)
Tübinger Strasse 81
71032 Böblingen, DE**

72 Inventor/es:

SWOBODA, WERNER

74 Agente/Representante:

DE PABLOS RIBA, Julio

ES 2 730 004 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la disgregación de material biológico así como dispositivo para su realización

5 Las sustancias activas, que sirven como medicamentos, suplementos alimenticios, aromas, sustancias olorosas, tintas, etc., u otras sustancias que pueden aprovecharse para el consumo o en la industria, presentes en la naturaleza, se encuentran a menudo en las células de materiales biológicos. Estos materiales biológicos están constituidos por células, que comprenden en cada caso una membrana celular, que rodea un contenido celular.

10 Para llegar a las diferentes sustancias activas, que están contenidas en el contenido celular pero también en la propia membrana celular, hay que abrir la membrana celular. Para ello se usan en particular procedimientos mecánicos para destruir la membrana celular. También se conocen procedimientos físicos (por ejemplo, cocción), procedimientos químicos y procedimientos biológicos (fermentación y similares) para la liberación de sustancias activas.

Por sustancia activa debe entenderse en este caso no solo una sustancia activa en el sentido farmacológico estricto, sino también cualquier sustancia económicamente interesante (por presencia o ausencia).

15 Recientemente se usa también la electroporación para la apertura de membranas celulares. Sin embargo, la electroporación está limitada a aquellos materiales biológicos, que comprenden células que contienen agua y/o aceite. Se conocen diferentes procedimientos de electroporación por los documentos WO 2005/056788 A, US 5 019 034 o DE 101 44 486 C1. Mediante la electroporación se consigue una disgregación más cuidadosa y más eficaz, en comparación con los procedimientos de disgregación celular conocidos, mencionados con anterioridad.

20 En los reactores de electroporación, en el caso de una mezcla que debe tratarse macroscópicamente igual, se producen en ocasiones en el caso de una mezcla que debe tratarse macroscópicamente igual descargas disruptivas, en las que toda o gran parte de la alta tensión aplicada se elimina a través de un canal de descarga delgado. Correspondientemente, una gran parte del material permanece sin tratar por este impulso de alta tensión. El canal de descarga creado por la descarga disruptiva o partes del mismo y los productos de descarga que permanecen en el mismo pueden formar además gérmenes para otras descargas disruptivas.

También las variaciones en la conductividad del material a tratar pueden perjudicar la eficacia de la electroporación.

La presente invención se ha planteado como objetivo mejorar adicionalmente la disgregación de las células, contrarrestando las influencias perturbadoras mencionadas anteriormente.

30 Este objetivo se alcanza según la invención mediante un procedimiento con las características indicadas en la reivindicación 1.

El procedimiento según la invención se basa en la idea de que es favorable ejecutar la electroporación con parámetros de funcionamiento, que garanticen una buena eficacia constante de la poración generada por los impulsos de campo.

35 El procedimiento según la invención según la reivindicación 1 permite establecer de manera sencilla e inequívoca, cuándo la intensidad de campo usada para la electroporación es demasiado grande, o cuándo el material tratado contiene heterogeneidades que no son suficientemente resistentes a las descargas disruptivas.

40 En la práctica, a menudo resulta que la composición de la mezcla de medio portador y material biológico fluctúa. Así, puede haber lotes, por ejemplo, en la disgregación de uvas, que presentan grados de maduración diferentes y un contenido en azúcar diferente. Según cuánto haya avanzado la maduración, las paredes celulares presentan una estabilidad mecánica diferente. Correspondientemente, resulta conveniente adaptar la magnitud de los impulsos de campo usados. Por otro lado, en el caso de impulsos de campo demasiado altos, pueden producirse descargas disruptivas en el reactor de electroporación, lo que tiene como consecuencia que el impulso de campo que provoca la descarga disruptiva no contribuye a la electroporación de las células.

45 En las reivindicaciones dependientes se indican perfeccionamientos ventajosos de los procedimientos según la invención.

Según la reivindicación 2 pueden detectarse las descargas disruptivas de manera sencilla con detectores que reaccionan a la luz.

En el procedimiento según la reivindicación 3 se detectan las descargas disruptivas mediante los golpes de presión generados en la mezcla.

50 Si en la mezcla sometida a electroporación se producen descargas disruptivas, entonces estas también pueden detectarse por la amplitud y la evolución temporal de los impulsos de corriente. La energía almacenada normalmente en un condensador se elimina mucho más rápidamente en el caso de existir una descarga disruptiva. Esto puede

aprovechase en el procedimiento según la reivindicación 4.

De manera especialmente sencilla pueden detectarse las descargas disruptivas porque se monitoriza la anchura del impulso de corriente mediante el reactor de electroporación o del impulso de alta tensión que se genera en la mezcla, como se indica en la reivindicación 5.

5 El procedimiento según la reivindicación 6 permite monitorizar permanentemente la conductividad, es decir también ya en las fases de tratamiento, en las que no se producen tensiones de descarga. De esta manera pueden establecerse y detectarse también aquellos casos, en los que la conductividad eléctrica es demasiado pequeña y no puede producirse ninguna tensión de descarga. Aumentando la conductividad de la mezcla pueden ajustarse entonces de nuevo las condiciones favorables para la electroporación. Además, este perfeccionamiento permite
10 contrarrestar ya los valores atípicos iniciales de la conductividad.

En el procedimiento según la reivindicación 7 se determina la desviación de la conductividad de la mezcla respecto del valor de consigna deseado ya antes de la electroporación. Esto permite una corrección especialmente rápida durante un pretratamiento o durante el mezclado del material biológico con el medio portador.

15 La reivindicación 8 indica diferentes parámetros para la electroporación, que deben modificarse primero, para seguir garantizando un funcionamiento sin fallos de la electroporación, en el caso de desviaciones de la conductividad, hasta que entonces, tras la reaproximación de la conductividad a su valor de consigna que solo puede hacerse más lentamente, también los parámetros de funcionamiento directos de la electroporación puedan retornar a sus valores normales.

20 También los parámetros indicados en la reivindicación 9 permiten aproximar las condiciones de electroporación con una constante de tiempo menor en comparación con la corrección de la conductividad de nuevo a aquellas condiciones, en las que la electroporación transcurre sin fallos.

Las reivindicaciones 10 y 11 se refieren a medidas, que posibilitan la reaproximación de la conductividad de la mezcla a su valor de consigna.

25 A este respecto, la reivindicación 12 menciona especialmente aquellos parámetros, que son ventajosos en un pretratamiento de material biológico con poco o nada de líquido. En el caso de un material de este tipo tiene que introducirse líquido en el interior de las células con un pretratamiento, para generar allí una conductividad débil.

También la reivindicación 13 se refiere a medidas, que suponen la variación de la conductividad de la mezcla de medio portador y material biológico en el marco de un tratamiento previo.

30 También mediante la variación de la tasa de realimentación de material desde una etapa de procedimiento a una etapa de procedimiento anterior según la reivindicación 14 puede controlarse la conductividad de la mezcla.

A este respecto, dado que la corriente de material realimentada se somete a un tratamiento intermedio, este también puede usarse según la reivindicación 15 para ajustar la conductividad de la mezcla suministrada al reactor de electroporación.

35 Las reivindicaciones 16 y 17 indican medidas, de cómo puede compensarse una efectividad reducida o aumentada de la electroporación y garantizarse un resultado constante en el material sometido a electroporación.

40 En algunos casos puede ser necesario, cuando se produce una alteración más grave de la conductividad eléctrica, lo que puede reconocerse por una acumulación de descargas disruptivas, tomar una medida de emergencia, para proteger la instalación y/o el material tratado. En la reivindicación 18 se indica un procedimiento para esto. Se entiende que el tomar una medida de emergencia también puede hacerse ya en el caso de producirse una primera descarga disruptiva.

La reivindicación 19 indica medidas de emergencia preferidas.

45 En los casos, en los que se controla (conjuntamente) la conductividad de la mezcla mediante la adición de un componente auxiliar, según la reivindicación 20 puede implementarse una rápida reaproximación de la conductividad a su valor de consigna, antes de que entonces a continuación a través de una variación del pretratamiento o a través de otra mezcla del material biológico que debe tratarse con medio portador se encargue de que también sin aditivo de conductividad o con la cantidad normal del mismo se obtenga la conductividad deseada de la mezcla.

La reivindicación 21 se refiere a un dispositivo para la realización del procedimiento según la invención, que puede implementarse usando sensores y circuitos habituales en el comercio.

50 El dispositivo según la reivindicación 22 proporciona de manera continua una señal característica para la conductividad actual de la mezcla.

Antes de describir detalladamente ejemplos de realización de la invención, se tratarán en primer lugar puntos de vista generales en la implementación de la invención, haciéndose referencia al caso más complejo de la

disgregación de material biológico con poco líquido. El caso más sencillo de la disgregación de material biológico, cuyas células ya contienen suficientemente líquido, tiene lugar lógicamente, omitiendo la etapa del enriquecimiento con líquido.

5 Algunos materiales biológicos, que contienen sustancias activas, apenas contienen agua o ya no contienen nada de agua en sus células. Estos son, por ejemplo, partes de plantas secadas o partes de plantas, que de por sí solo tienen un contenido en agua reducido, por ejemplo, cortezas, determinadas raíces de plantas o acículas de abetos, pinos carrascos, etc.

10 Según la invención, al material biológico con poco líquido primero se le suministra en una primera etapa de procedimiento un medio de penetración, que se incorpora a las células, y en una segunda etapa de procedimiento se distribuyen las paredes celulares del material biológico enriquecido con el medio de penetración en un medio portador y se destruyen mediante electroporación.

15 Se tienen en cuenta en particular medios de penetración líquidos y gaseosos. Tienen en general el objetivo de ajustar la conductividad eléctrica de las células a un valor, que se encuentra en el espectro de conductividad de las células vivas ricas en líquido, por ejemplo, el de las hojas de árboles de hoja caduca, lechugas y frutas. En la práctica esto significa una conductividad de un mosto producido a partir de los materiales mencionados en último lugar de desde aproximadamente 0,1 mS/cm hasta aproximadamente 100 mS/cm, en la mayoría de los casos entre aproximadamente 0,5 mS/cm y 30 mS/cm.

20 Por material biológico debe entenderse en las reivindicaciones y en la presente descripción cualquier material, en el que un contenido celular está encerrado por una pared celular. A este respecto puede tratarse tanto de materiales eucarióticos (tales como materiales vegetales) como de células procariotas.

Estos materiales se diferencian de manera notable en el tamaño de sus células. En el caso de un diámetro de célula menor se usa una intensidad de campo eléctrico correspondientemente mayor en la electroporación, para conseguir una caída de tensión a través de las células individuales en el intervalo de desde aproximadamente 0,5 V hasta aproximadamente 2 V.

25 Los medios que pueden usarse para crear o recrear una conductividad en células biológicas se designan en las reivindicaciones y en la descripción como medios de penetración, dado que penetran a través de las paredes celulares o puntos carentes de las mismas al interior celular.

A este respecto, en primera línea se trata de líquidos y gases (en particular vapores) con las correspondientes propiedades eléctricas.

30 Dado que muchas células que contienen poca o nada de agua contienen sales, a menudo es suficiente introducir agua normal o vapor de agua en las células, para generar en las mismas una conductividad eléctrica.

35 Entre los líquidos de penetración adecuados se encuentra no solo el agua, sino también disoluciones acuosas, por ejemplo, soluciones salinas isotónicas o disoluciones biológicamente activas comparables. Sin embargo, también pueden usarse otros líquidos y gases que no se encuentran normalmente en células, que presentan una conductividad eléctrica similar, cuando se absorben solo en una etapa de pretratamiento de líquido en las células del material biológico.

En el procedimiento según la invención las células enriquecidas con medio de penetración del material biológico en un medio portador se llevan a un campo eléctrico alterno, tal como se usa normalmente para la electroporación.

40 Los medios portadores adecuados tienen una conductividad eléctrica débil. Por esto debe entenderse una conductividad, que no es esencialmente mejor, preferiblemente peor, que la conductividad de las células, para que los impulsos de corriente que fluyen durante la electroporación no pasen de largo por las células.

Por tanto, los valores de conductividad típicos para medios portadores buenos se encuentran en el intervalo de pocos mS/cm.

45 Una propiedad básica adicional de los medios portadores es su resistencia a la perforación bajo los campos eléctricos usados para la electroporación (normalmente desde 1 kV/cm hasta 100 kV/cm).

Un campo de electroporación comprende un gran número de impulsos de campo estrechos y altos sucesivos, seleccionándose la intensidad de campo con una magnitud tal que los canales iónicos y/o poros pequeños ya existentes en las paredes celulares se amplían, o se crean nuevos poros en las paredes celulares.

50 Como líquido portador es particularmente adecuada el agua ligeramente conductora. Por ligeramente conductora debe entenderse en este contexto un agua, que presenta una calidad de agua potable típica o una calidad de agua para uso industrial elevada, es decir un agua con una conductividad de desde 0,1 mS/cm hasta aproximadamente 10 mS/cm.

Sin embargo, en lugar de agua también pueden usarse otros líquidos, siempre que presenten las propiedades

eléctricas correspondientes, que garanticen que en las células individuales del material que debe disgregarse, en los bordes opuestos se alcancen diferencias de potencial del orden de 0,5 V a 2 V o más.

5 La disgregación de material biológico puede tener lugar no solo con el propósito de extraer tras la disgregación una sustancia activa útil, sino también en cuanto al propósito de eliminar del material disgregado una sustancia nociva indeseada, por ejemplo, en un alimento una sustancia amarga indeseada o similar.

La electroporación usada según la invención se conoce en sí con materiales biológicos que contienen agua, como muestra el artículo de Bluhm, Frey *et al.*, en Nachrichten des Forschungszentrums Karlsruhe, año 35, número 3, 2003, páginas 105 a 110. El documento DE 101 44 486 C1 da a conocer también la disgregación y la pasteurización de materiales orgánicos mediante electroporación con el ejemplo de remolachas azucareras.

10 Sin embargo, estos procedimientos conocidos no son adecuados, tal como se ha expuesto al principio, para aquellos materiales biológicos, que tienen poco líquido.

Tampoco se toma en los mismos ninguna medida, para contrarrestar la aparición de descargas disruptivas.

Por el contrario, mediante la presente invención se hace posible obtener también en el caso de materiales exigentes una disgregación cuidadosa y muy eficaz de las células.

15 Esto se consigue con un aporte de energía reducido (en comparación con los métodos térmicos) y con un calentamiento reducido del material biológico y con ello cuidadosa. Se mejora el rendimiento en la extracción de sustancias activas y sustancias nocivas en una etapa de extracción que sigue a la disgregación. El tiempo de tratamiento se acorta. La disgregación también tiene lugar de manera esencialmente síncrona en todo el volumen y con ello homogénea.

20 A continuación se explicará más detalladamente la invención mediante ejemplos de realización haciendo referencia a los dibujos. Los dibujos muestran:

La Figura 1, una representación esquemática de un procedimiento según la invención para disgregar material vegetal seco o con poca agua;

25 La Figura 2, una representación esquemática de una instalación para introducir líquido en material biológico seco así como para la electroporación del material biológico vuelto a enriquecer con líquido;

La Figura 3m una representación similar a la de la Figura 1, en la que sin embargo se reproduce un procedimiento modificado;

La Figura 4, una representación similar a la de la Figura 2, estando sin embargo el reactor de electroporación colocado verticalmente y usándose una unidad de conmutación de alta tensión modificada;

30 La Figura 5, una vista similar a la de la Figura 4, en la que sin embargo se muestra una unidad de conmutación de alta tensión nuevamente modificada;

La Figura 6, un diagrama de bloques de una rutina principal, según la cual un ordenador ajusta la conductividad de la mezcla de medio portador y material biológico que se mueve a través del reactor de electroporación; y

La Figura 7, una subrutina de la rutina principal mostrada en la Figura 6.

35 A una estación 10 de trituración se le suministra según la Figura 1 una corriente 12 de materiales vegetales secados a disgregar. A este respecto puede tratarse de flores de tilo secadas, menta seca u otras flores u hojas secadas de plantas medicinales. Sin embargo, a este respecto también puede tratarse de otras partes de plantas secadas, por ejemplo, raíces de plantas secadas (por ejemplo, raíces de gatuña). El material vegetal puede ser también uno que por sí solo contenga muy poco líquido, por ejemplo, cortezas, madera, huesos de frutas, semillas o similares.

40 La estación 10 de trituración puede comprender medios para cortar, trocear, moler, apretar o prensar el material vegetal. Mediante la flecha 14 se indica una corriente de materiales vegetales triturados. Esta se suministra a un reactor 16 de pretratamiento, que contiene un líquido débilmente conductor, en particular agua.

45 El material vegetal molido permanece en contacto con el agua un tiempo suficiente en el reactor 16 de pretratamiento; lo suficiente para que el agua penetre en el interior de las células. Esta penetración de agua puede ayudarse ajustando el contenido del recipiente 16 de pretratamiento a una temperatura, que en el caso de un recipiente de pretratamiento sin presión y el uso de agua como líquido de penetración puede encontrarse entre 5°C y 95°C.

50 Alternativamente puede llevarse a cabo la introducción de agua en las células del material vegetal con vapor de agua sobrecalentado, prefiriéndose una temperatura de hasta aproximadamente 150°C por motivos de los aparatos y motivos de protección del material biológico.

- De nuevo en cuanto al buen trato del material vegetal y en particular de las proteínas contenidas en el mismo se prefiere una temperatura del vapor de agua de desde aproximadamente 50°C hasta aproximadamente 80°C, reduciéndose ventajosamente también la presión del vapor de agua tanto que el agua entra en ebullición a dicha temperatura. Esto significa a una temperatura de 80°C una presión de aproximadamente 0,47 bar, a 70°C una presión de 0,32 bar y a 50°C una presión de 0,12 bar.
- 5 Debe indicarse que la temperatura de funcionamiento y la duración de tratamiento en el reactor 16 de pretratamiento se seleccionan en cuanto a favorecer la entrada de agua en el interior de las células, pero no en cuanto a eliminar mediante lavado sustancias activas de las células.
- 10 Tras un tiempo de permanencia suficiente en el reactor 16 de pretratamiento se pasa una corriente de mosto representada simbólicamente con 18 de material biológico triturado y enriquecido de nuevo con agua y agua a un reactor 20 de electroporación. Allí se somete el mosto a una sucesión de impulsos de campo altos muy cortos, cuyo amplitud está determinada de tal manera que a lo largo de una célula haya una caída de tensión de aproximadamente 0,5 a 2 V.
- 15 En el caso de dimensiones celulares en el intervalo de desde algunas micras hasta algunos cientos de micras así como en el caso de conductividades habituales de mostos vegetales de desde algunos cuantos $\mu\text{S}/\text{cm}$ hasta algunos cuantos mS/cm esto significa que se generan en el interior del reactor de electroporación intensidades de campo eléctrico en el intervalo de entre 1 kV/cm y 100 kV/cm .
- 20 Según cada caso, se seleccionará la intensidad de campo según el material a disgregar. A este respecto, también puede compensarse en menor medida aumentando la longitud de los impulsos de campo individuales una parte de la amplitud que falte de los impulsos de campo, lo que posibilita el uso de un generador de impulsos más sencillo y más económico.
- Por consiguiente, en la salida del reactor 20 de electroporación se obtiene una corriente 22 de material, que comprende ahora agua de penetración restante que sirve como medio portador, envueltas de pared celular y contenidos celulares.
- 25 La corriente 22 de material disgregada llega dado el caso tras la separación del agua portadora a una estación 24 de extracción/estación de tratamiento posterior, en la que usando un disolvente adecuado y/o físicamente (mecánicamente y/o por presión y/o calentamiento) se extrae mediante disolución la sustancia activa deseada del contenido celular y/o las paredes celulares (mediante la destrucción de las paredes celulares se vuelven también más accesibles las sustancias almacenadas en y/o dentro de las mismas para una extracción).
- 30 Puede sacarse una corriente 26 de extracto de la estación 24 de extracción, mientras se desecha una corriente 28 residual de material, que comprende el agua portadora y las partes no extraídas de la corriente 22 de material que quedan en la misma.
- 35 El procedimiento descrito anteriormente puede realizarse por lotes o de manera continua, dotándose los diferentes reactores de esclusas giratorias que funcionan de manera continua o válvulas accionadas intermitentemente de manera correspondiente, lo que no es necesario explicar en este caso detalladamente.
- También se seca a menudo en primer lugar material animal, del que deben obtenerse sustancias activas, para poder almacenarlo más tiempo antes del procesamiento o poder transportarlo de manera económico en trayectos más largos. Entonces puede procesarse exactamente como se describió anteriormente haciendo referencia a los materiales vegetales.
- 40 En el caso de los ejemplos de procedimiento descritos anteriormente se trata de aquellos en los que deben obtenerse sustancias activas orgánicas a partir de los materiales de partida. Se entiende que este procedimiento también puede usarse igualmente para obtener sustancias inorgánicas a partir de material biológico ("lixiviación").
- 45 En los procedimientos descritos anteriormente, también resultaban de interés las sustancias activas obtenidas del material de partida. Sin embargo, también puede usarse el procedimiento según la invención como procedimiento de limpieza, en el que de un material de partida se separa una sustancia nociva soluble indeseada. En este caso se desecha entonces la corriente 26 de extracto, mientras que la corriente 28 residual de material se lleva a un aprovechamiento adicional.
- 50 En la Figura 1 se representan modificaciones del procedimiento descrito anteriormente, mediante líneas discontinuas.
- Las primeras variaciones del procedimiento se refieren a que al menos una parte de la corriente 22 de material se lleva de nuevo a una etapa de procedimiento anterior.
- Para algunos materiales puede resultar ventajoso no llevar a cabo una disgregación completa del material en una única pasada a través del reactor 20 de electroporación, dado que esta llevaría entonces demasiado tiempo (y energía). Por tanto, la corriente de material se realimenta según una variante a un recorrido 30 a través de una

estación 32 de tratamiento intermedio a la entrada del reactor 20 de electroporación.

5 El tratamiento 32 intermedio puede comprender simplemente un almacenamiento de la corriente de material tratada por electroporación en un recipiente durante un periodo de tiempo predeterminado, en el que mediante un hinchamiento adicional partiendo de perforaciones ya generadas se crean nuevos puntos de ataque para una etapa de electroporación adicional.

Sin embargo, el tratamiento intermedio también puede consistir en un tratamiento químico, que, a partir de los defectos generados en la primera etapa de electroporación, forma en las paredes celulares nuevos puntos de ataque para una electroporación adicional posterior.

10 También, al hacer que se difunda un líquido eléctricamente más conductor al interior de las células a través de los defectos de pared celular generados durante la primera electroporación, en el caso de una electroporación adicional, en la que se usa además líquido portador poco conductor, se puede dirigir la corriente a través del reactor con mayor intensidad a través del interior de las células individuales y mejorar así su destrucción.

15 En una variante adicional se realimenta una parte de la corriente 22 de material a través de un recorrido 34 a la entrada del reactor 16 de pretratamiento. Se obtiene así un relleno más completo de las células individuales con líquido, dado que esto se ayuda mediante defectos generados en la pared durante la primera electroporación.

Finalmente, puede realimentarse una parte de la corriente 22 de material a través de un recorrido 36 también a la entrada de la estación 10 de trituración y utilizar así durante la trituración mecánica el que el material ya se debilitó mecánicamente durante la primera electroporación. Así también puede triturarse muy finamente el material con un aporte de energía reducido, lo que en el caso de material seco con paredes celulares intactas era más difícil.

20 Unas variantes adicionales del procedimiento mostrado en la Figura 1 consisten en que parte de la corriente 28 residual de material se realimenta a etapas anteriores del procedimiento. Estas realimentaciones están indicadas mediante recorridos 38, 40, 42, que llevan de vuelta al reactor 20 de electroporación, al reactor 16 de enriquecimiento o a la estación 10 de trituración. Las ventajas obtenidas con ello radican en general en una disgregación más intensa, de manera similar a como se describe para los recorridos 30, 34, 36.

25 Para controlar los caudales en los recorridos 30, 34, 36, 38, 40, 42 están previstos en los mismos los correspondientes reguladores D30, D34, D36, D38, D40, D42 de caudal. Estos pueden estar formados en el caso concreto por una válvula proporcional, que se mueve mediante un servomotor, que a su vez se activa mediante un control.

30 En una modificación adicional del procedimiento mostrado en la Figura 1, en los recorridos 34 a 42 también pueden estar previstos tratamientos intermedios, para debilitar adicionalmente las paredes celulares y mejorar así la separación entre componentes deseados e indeseados del material biológico.

La Figura 2 muestra esquemáticamente detalles del reactor 16 de pretratamiento y del reactor 20 de electroporación así como un control asociado.

35 El reactor 16 de pretratamiento comprende un recipiente 44 con una sección de salida cónica, que está cerrada de manera estanca a la presión y a la que a través de un primer conducto 46 se le suministra agua y a través de un segundo conducto 48 el material biológico triturado, que proporciona la estación 10 de trituración.

Los reguladores D46 y D48 de caudal controlables sirven de nuevo para ajustar las corrientes de material en los conductos 46 y 48.

40 En el interior del recipiente 44 se representa esquemáticamente un volumen 50 de agua y material biológico triturado.

Está previsto un motor 52 eléctrico para hacer girar un agitador 54.

45 En el recipiente 44 está prevista una varilla 56 de acondicionamiento térmico, para llevar el contenido del recipiente a una temperatura diferente de la temperatura ambiente, que normalmente puede encontrarse entre aproximadamente 5°C y aproximadamente 95°C, preferiblemente entre aproximadamente 15°C y aproximadamente 50°C.

La temperatura predominante en el recipiente 44 se mide mediante un sensor 58 de temperatura.

El interior del recipiente 44 se evacúa usando una bomba 60 de vacío, para aspirar las partes de aire residual de la mezcla de agua y material biológico molido. Un sensor 61 de presión monitoriza el vacío en el recipiente 44.

50 La salida de la bomba 60 de vacío está conectada a través de una trampa 62 de frío con un conducto 64 de aire de escape. El condensado que se acumula en la trampa 62 de frío puede extraerse a través de una válvula 66.

En el caso del condensado puede tratarse, según el material biológico usado, por ejemplo, de aceites esenciales

muy volátiles, que pueden reutilizarse.

La salida del recipiente 44 está conectada con una bomba 68 de tornillo sin fin, que se acciona mediante un motor 70 eléctrico, cuyo número de revoluciones puede controlarse.

5 La salida de la bomba 68 de tornillo sin fin está conectada con la entrada del reactor 20 de electroporación mediante un conducto 72. Allí, la bomba 68 de tornillo sin fin mantiene una presión atmosférica o una sobrepresión, con lo que se garantiza que en el reactor 20 de electroporación bajo los campos eléctricos que predominan allí se mantenga bajo el número de tensiones de descarga condicionadas por inclusiones de gas.

10 Para aproximar la presión ajustada en el interior del reactor 20 de electroporación mediante la bomba 68 de tornillo sin fin a la presión atmosférica (u otra presión posterior), en un conductor 73 de salida que evacúa el material sometido a electroporación está prevista una esclusa 75 de rueda de células. Alternativamente, para la disminución de la presión puede usarse un estrangulador, un regulador de caudal o una válvula, para un aumento de la presión adicional una bomba adicional.

15 El reactor 20 de electroporación tiene una carcasa 74 fabricada de material resistente a los golpes y aislante resistente a la perforación, que presenta un canal 78 de reacción plano con sección transversal rectangular. En la práctica, la altura del canal 78 de reacción puede ascender a aproximadamente de 5 mm a 200 mm, preferiblemente a aproximadamente 40 mm.

Como material para la carcasa 74 se tienen en cuenta en particular: plásticos y plásticos reforzados con fibras, en particular plásticos transparente o translúcidos tales como policarbonato; vidrio, en particular vidrio compuesto; cerámica industrial altamente resistente, dado el caso también reforzada con fibras.

20 En la superficie de delimitación superior e inferior en los dibujos del canal 78 de reacción están insertados a ras unos electrodos 80, 82, que están configurados como placas metálicas. Preferiblemente, el material de placa (dado el caso como recubrimiento) comprende acero inoxidable, titanio o titanio-iridio, metal noble, en particular oro, plata y platino.

Los electrodos 80, 82 están redondeados cuidadosamente en los cantos, para evitar allí picos de campo.

25 De estos, el electrodo 82 inferior está conectado a través de una resistencia 84 de medición a tierra, mientras que el electrodo 80 superior está conectado a través de un conmutador 86 controlable con una batería de condensadores, que se representa como un único condensador 88.

Un divisor 89 de tensión permite la medición de la tensión existente en los electrodos 80, 82 y en relación con el sensor de corriente formado por la resistencia 84 de medición la medición de la potencia eléctrica.

30 La carga del condensador 88 tiene lugar a través de una resistencia 90 de carga mediante una unidad 92 de carga de alta tensión. Esta, para reactores de electroporación más pequeños, tal como puede usarse en relación con la disgregación de plantas medicinales, necesita proporcionar solo corrientes de algunos mA hasta algunos A.

35 Para controlar el conmutador 86 está previsto un circuito 94 de control, que obtiene en dos terminales de entrada una señal τ , que indica la longitud de un impulso de conmutación, así como una señal T, que indica la distancia en el tiempo de impulsos de conmutación.

Adicionalmente, el circuito 94 de control puede presentar un terminal V de control, en el que puede predeterminarse a qué tensión debe accionarse el conmutador 86.

40 Las señales τ , T y V de control se proporcionan por un ordenador 96 de proceso. Como se indica mediante un haz D de conductores, el ordenador 96 de proceso proporciona también el control de los diferentes reguladores D de caudal, que están previstos en conductos de la instalación, tal como se describió anteriormente.

45 En el ordenador 96 de proceso pueden introducirse a través de un teclado 98 valores característicos para el material biológico que debe disgregarse en cada caso. Usando estos valores característicos y estos conjuntos asociados de parámetros de funcionamiento, que están depositados en una memoria 100 del ordenador 96 de proceso, el ordenador 96 de proceso calcula los valores más favorables en cada caso para el material biológico en cuestión para la tensión, a la que debe cargarse el condensador 88, para la anchura τ de los impulsos de conmutación y para la distancia T de los impulsos de conmutación así como para parámetros de funcionamiento adicionales de la instalación de electroporación inclusive el reactor 16 de pretratamiento y otras partes de instalación mostradas en la Figura.

50 Un monitor 102 sirve para presentar visualmente parámetros de funcionamiento de la instalación y para el control de entradas.

Valores típicos para τ son de aproximadamente 10 ns a aproximadamente 100 μ s, preferiblemente de aproximadamente 100 ns a aproximadamente 50 μ s.

Valores típicos para $1/T$ son de aproximadamente 0,1 Hz a aproximadamente 500 Hz, preferiblemente de aproximadamente 0,2 Hz a aproximadamente 50 Hz, aún más preferiblemente de aproximadamente 0,5 Hz a aproximadamente 40 Hz.

5 Cada vez que se cierra uno mediante un impulso de conmutación de los conmutadores 86, el condensador 88 se descarga a través del volumen de mosto, que se encuentra en ese momento entre los dos electrodos 80 y 82. A este respecto, aparecen durante un breve tiempo corrientes en el intervalo de algunos miles de A.

10 Mediante estas corrientes se generan, teniendo en cuenta la conductividad eléctrica del mosto entre las secciones superior e inferior de la pared celular de una célula, diferencias de tensión en el intervalo de aproximadamente 2 V. Estas diferencias son tan grandes que los canales iónicos y poros pequeños ya existentes en las paredes celulares se ensanchan de manera irreversible y así se destruye la pared celular.

Cuando la conductividad del mosto es demasiado pequeña, la corriente, que fluye a través del mosto al cerrar el conmutador 86, es demasiado pequeña. A la inversa, si la conductividad eléctrica del mosto es demasiado grande, entonces debido a la buena conductividad del mosto en las células individuales no se genera una caída de tensión suficiente para que tenga lugar una destrucción de las paredes celulares.

15 Por este motivo, la conductividad del mosto tiene que encontrarse en una determinada ventana, cuyo límite inferior se encuentra a aproximadamente 0,1 mS/cm y cuyo límite superior se encuentre a aproximadamente 100 mS/cm.

Para monitorizar de manera continua la conductividad del mosto está prevista la resistencia 84 de medición, que está conectada con una entrada del ordenador 96 de proceso. Alternativa o adicionalmente, también puede usarse el divisor 89 de tensión.

20 El ordenador 96 de proceso varía en el caso de establecer una variación de conductividad inmediatamente la tensión, a la que se carga el condensador 88, de tal manera que se obtiene de nuevo la misma caída de tensión en una célula, de modo que la rotura de las paredes celulares tiene lugar además de manera segura. Sin embargo, esta medida conduce a una mayor carga de la unidad 92 de carga de alta tensión.

25 Por tanto, al mismo tiempo el ordenador 96 de proceso influirá en la producción del mosto de tal manera (a través del control de la temperatura, la agitación y las cantidades de material biológico y agua añadidas), que la conductividad eléctrica del mosto vuelve de nuevo al intervalo normal. En la medida, en la que se consigue esto, puede devolverse entonces la tensión de carga del condensador 88 de nuevo al valor de partida.

30 La velocidad de transporte de las células correspondiente a la velocidad de flujo del agua portadora a través del reactor de electroporación está dimensionada de tal manera que las células se sometan a un número suficiente de impulsos de campo, para destrozarse las paredes celulares con tanta intensidad que del contenido de la célula o de las paredes celulares en una etapa de tratamiento posterior con un rendimiento deseado y un tiempo de extracción deseado puedan extraerse sustancias activas.

35 El número total de los impulsos de campo, a los que se somete el material celular en el reactor 20 de electroporación, la anchura y la frecuencia de los impulsos de campo y su altura, la temperatura durante la electroporación así como los parámetros de funcionamiento durante la preparación del mosto (grado de trituración del material biológico seco, la relación de mezcla con agua, los aditivos de pretratamiento usados por ejemplo, la temperatura durante el pretratamiento, la duración del pretratamiento, tiempos de almacenamiento intermedios) se determinan experimentalmente en cada caso para un determinado material a disgregarse para un determinado propósito y se mantienen listos en la memoria 100 para una consulta a través del teclado 98. A este respecto, puede partirse de parámetros, que se determinaron anteriormente para células similares desde el punto de vista del tamaño de célula y de la composición.

45 En una modificación del ejemplo de realización descrito anteriormente puede sustituirse el conmutador 86 por un tramo de descarga de gas. A este respecto, se aprovecha la propiedad de un tramo de descarga de gas, de que este se rompe al aplicar una tensión predeterminada. Esta tensión de ruptura puede controlarse a través de la presión del gas encerrado en el tramo de descarga de gas. Por consiguiente, un control de presión para el tramo de descarga de gas sustituye en el efecto el circuito 94 de control.

El procedimiento ilustrado en la Figura 3 se diferencia de aquel en la Figura 1, en que para volver a producir una conductividad en el interior de las células se usa un líquido de penetración, que se diferencia del líquido portador, que sirve para portar las células a través del reactor de electroporación.

50 Los componentes de la instalación mostrada en la Figura 3, que ya se han abordado haciendo referencia a la Figura 1, están dotados de nuevo de los mismos números de referencia y no tienen que describirse detalladamente de nuevo. También se han omitido en la Figura 3 las diferentes variantes de una realimentación de producto en el proceso por motivos de claridad. Se entiende que pueden preverse recorridos de realimentación, que corresponden a los recorridos 30, 34, 36, 38, 40 y 42 de la Figura 1, también en la instalación según la Figura 3.

55 La instalación según la Figura 3 se diferencia de aquella según la Figura 1 en que se usa una corriente de líquido

portador separada, para portar las partículas del biomaterial que debe disgregarse a través del reactor 20 de electroporación.

5 En particular, como líquido de penetración puede usarse agua, al que se han añadido sustancias que aumentan la conductividad, en particular sales, mientras que como líquido portador se usa agua corriente normal con poca conductividad o agua desionizada o destilada.

10 El líquido portador también puede ser uno que no se mezcla con el líquido de penetración usado en el reactor 16 de pretratamiento. Preferiblemente, en el reactor 16 de pretratamiento se usa agua o una disolución acuosa. Un líquido de penetración de este tipo puede atravesar bien por regla general las paredes celulares, pudiendo añadirse dado el caso una sustancia tensioactiva, para atacar las capas de cera o capas de grasa portadas por las superficies celulares. Como líquido portador inmiscible con agua se usa entonces un aceite que conduce en el intervalo de conductividad de desde 0,1 mS/cm hasta 10 mS/cm.

15 También se tienen en cuenta gases como medios portadores, siempre que sean débilmente conductores y resistentes a la perforación. Para evitar una segregación por gravedad de medio portador y material biológico, a este respecto se atraviesa verticalmente el reactor 20 de electroporación. Lo mismo es aplicable para partes de instalaciones aguas arriba y aguas abajo.

A la salida del reactor 16 de pretratamiento está conectada una etapa 104 de separación, que separa el líquido de penetración no absorbido por el material biológico. La etapa 104 de separación puede ser, por ejemplo, un filtro o una centrífuga. El líquido de penetración separado en la misma puede realimentarse a través de un conducto 106, que puede contener una unidad 107 de regeneración, al reactor 16 de tratamiento previo.

20 Un regulador D106 de caudal controlable, que puede presentar una estructura similar, tal como el regulador de caudal descrito haciendo referencia a las Figuras anteriores, predetermina el tamaño de la corriente de material en el conducto 106.

25 Una corriente 18b correspondiente a la corriente 18a de mosto, pero que ya solo contiene poco líquido de penetración, de material biológico enriquecido de nuevo con líquido se suministra a una entrada de una etapa 108 de mezclado, cuya otra entrada obtiene el medio portador. En la salida de la etapa 108 de mezclado se obtiene una corriente 110 de material de medio portador y biomaterial, cuyas células de nuevo están llenas de agua.

La corriente 110 de material atraviesa entonces el reactor 20 de electroporación, destruyéndose las paredes celulares del material de nuevo mediante los impulsos de campo afilados y altos.

30 La corriente 22 de material obtenida en la salida del reactor 20 de electroporación se guía entonces a una etapa 112 de separación adicional, en la que se separan el medio portador por un lado y las células destruidas del material biológico por otro lado. Para ello pueden usarse de nuevo procedimientos físicos conocidos, por ejemplo, filtración o centrifugación.

35 El medio portador se realimenta a través de un conducto 114 y una etapa 116 de regeneración de nuevo a la etapa 108 de mezclado, mientras que la corriente de paredes celulares y contenidos celulares se suministran a la estación 24 de extracción.

Un regulador D114 de caudal controlable predetermina cuánta mezcla se realimenta a través del conducto 114.

De esta manera es posible ajustar diferentes conductividades en el medio portador y en el interior de las células que deben destruirse, de tal manera que la corriente que fluye entre los electrodos de la estación de electroporación fluye preferiblemente a través de las células, donde las mismas están disponibles.

40 En el ejemplo de realización según la Figura 4, que es muy similar a aquel según la Figura 2, el reactor 20 de electroporación está situado con una orientación vertical del canal 78 de tratamiento.

En el ejemplo de realización según la Figura 4, el conmutador 86 se conmuta mediante un circuito 94 de control, que funciona en función de la tensión en el condensador 88. El circuito 94 de control se reproduce esquemáticamente como comparador con tensión V de comparación ajustable.

45 Si en el ejemplo de realización según la Figura 4 la tensión en el condensador 88 alcanza un valor predeterminado, entonces el circuito 94 de control cierra el conmutador 86, y la carga almacenada en el condensador fluye en forma de impulsos a través de los electrodos 80, 82 y la mezcla que se encuentra entre los mismos así como la resistencia 84 de medición respecto a tierra. El conmutador 86 se abre entonces de nuevo y el condensador 88 se carga de nuevo mediante la unidad 92 de carga a través de la resistencia 90 de carga. Por consiguiente, toda la disposición
50 funciona como generador de impulsos de alta tensión.

En el ejemplo de realización según la Figura 5, el conmutador 86 está sustituido por un tramo 86' de descarga. Este se rompe en cada caso cuando la tensión en sus electrodos supera un valor predeterminado. La tensión de ruptura depende del tipo del gas, que se encuentra en el tramo 86' de ruptura y de su presión.

Para ello está previsto un recipiente 116 de reserva, que contiene una reserva del gas de trabajo usado en el tramo 86' de ruptura. La salida del recipiente 116 de reserva está conectada a través de un regulador 118 de presión regulable con el tramo 86' de ruptura, ilustrándose la fuerza de cierre ajustable mediante un electroimán 120, que se alimenta con corriente desde el ordenador 96 de proceso.

- 5 En una modificación adicional, en la instalación según la Figura 5 en la carcasa 74 está previsto un detector 122 de luz y un sensor 124 de presión (o micrófono), cuyas señales de salida se llevan a una puerta O (la una o la otra) y van a una entrada del ordenador 96 de proceso.

Si en el canal 78 de reacción tiene lugar una descarga disruptiva, entonces se registra el destello de luz correspondiente o la onda de presión o de sonido correspondiente por los detectores 122, 124, y el ordenador 96 de proceso puede entonces poner remedio, tal como se describirá aún más en detalle más adelante.

10 Finalmente, en la instalación según la Figura 5 en la salida de la bomba 68 de tornillo sin fin está previsto un sensor 126 de conductividad, que está conectado con el ordenador 96 de proceso.

Puede preverse un sensor 128 de conductividad adicional en el interior del recipiente 44.

- 15 Haciendo referencia a las Figuras 6 y 7 ahora se esbozará el funcionamiento del ordenador 96 de proceso, en la medida en que sirve para mantener en el reactor 20 de electroporación buenas condiciones de trabajo constantes.

Para ello, el ordenador 96 de proceso por un lado monitoriza la conductividad de la mezcla de medio portador y material biológico desde el recipiente 44 hasta el interior del canal 78 de reacción (allí a través de la medición de los impulsos de corriente, que discurren a través de la resistencia 84 de medición).

- 20 Además, el ordenador 96 de proceso monitoriza si en el interior del canal 78 de reacción se producen tensiones de descarga. Puede hacer esto mediante los impulsos de luz, que inciden sobre el sensor 122 de luz, mediante impulsos de presión o impulsos de sonido, que alcanzan el sensor de presión o el micrófono 124, y también mediante la anchura de los impulsos de corriente, que fluyen a través de la resistencia 84 de medición, y/o de los impulsos de tensión, que proporciona el divisor 89 de tensión.

- 25 Básicamente, una rutina principal del ordenador 96 de proceso funciona en dos etapas de diferente prioridad: monitorización de la descarga disruptiva (de orden superior) y regulación de la conductividad (de orden inferior).

A este respecto, el ordenador 96 de proceso funciona de manera cíclica mediante impulsos, que también sirven para el control de circuito 94 de control o se derivan de la tensión que cae en la resistencia 84 de medición y/o de la tensión de salida del divisor 89 de tensión.

- 30 En primer lugar se comprueba en un bloque 130, si la tensión aplicada en cada caso ha conducido a una descarga disruptiva.

Si este no es el caso, se aumenta un contador de impulsos de campo (bloque 132) en uno. A continuación se desencadena el control de la conductividad (bloque 134), que se representa más detalladamente en la Figura 7.

- 35 Si se establece una descarga disruptiva, entonces se reduce en primer lugar en un bloque 136 la tensión hasta la que se carga el condensador 88, o a la que se cierra el conmutador 86. Esto puede tener lugar mediante la variación de la señal de referencia para el circuito 94 de control o la alimentación con corriente del electroimán 120. La tensión se reduce en el caso de cada descarga disruptiva que aparece en un incremento predeterminado, que según la experiencia sirve para, en un impulso de campo siguiente, atenuar la aparición de una descarga disruptiva.

- 40 En una etapa siguiente se asume en un bloque 138 un valor preferente para el modo Pv de proceder adicional de una parte de programa de orden superior. Esta sirve para elegir una de una pluralidad de medidas, que igualmente pueden servir para atenuar la aparición de una descarga disruptiva en el canal 78 de reactor.

- 45 A estas pueden pertenecer aumentar durante un breve tiempo la velocidad v de transporte de la mezcla, para descargar del reactor de electroporación un intervalo heterogéneo demasiado conductor de la mezcla, antes de que se aplique el siguiente impulso de alta tensión. Si para el programa de orden superior puede reconocerse que se trataba de una descarga disruptiva previsiblemente singular, entonces el programa de orden superior puede considerar pertinente precisamente de manera opuesta la reducción de la velocidad de transporte, para que el material que se encuentra en el canal 78 de reactor esté expuesto a un impulso de alta tensión adicional y por consiguiente al abandonar el reactor de electroporación haya experimentado el número de impulsos convencional.

- 50 Tras la variación que ha tenido lugar en el bloque 140 de la velocidad de transporte (o el mantenimiento de la velocidad de transporte), en un bloque 142 adicional de un programa de orden superior se asume un valor PT preferente adicional, que indica si la distancia T , en la que se aplica el siguiente impulso de alta tensión al reactor 20 de flujo, se proporciona más rápido o más lento. Esta modificación de la distancia entre impulsos tiene lugar en el bloque 144.

Entonces se vuelve desde allí al punto S inicial de la rutina principal.

Si se establece una descarga disruptiva, entonces se aumenta al mismo tiempo en el bloque 146 un contador de descarga disruptiva en uno. Este se retrocede a intervalos regulares mediante otra parte de programa, tal como se indica mediante un terminal R de retroceso.

5 En un bloque 148 se establece si el nivel del contador de descarga disruptiva es mayor que un número predeterminado (1, 2, 3,...). Si este es el caso, se toma una medida de emergencia en un bloque 150.

Esta se seleccionará entonces del siguiente grupo: alarma y/o condición de error de toda la instalación; suprimir impulsos de alta tensión adicionales durante un tiempo predeterminado; rápida disminución de la conductividad de la mezcla que se encuentra en el canal 78 de reactor mediante un rápido suministro de una mayor cantidad de agua pura; rápida expulsión del contenido del canal 78 de reactor.

10 La Figura 7 muestra un subprograma, que el ordenador 96 de proceso usa para mantener la conductividad de la mezcla que se encuentra en el canal 78 de reactor dentro de un intervalo de conductividad predeterminado, que está predeterminado por un límite superior y un límite inferior.

En un bloque 152 tiene lugar la medición de conductividad continua en el canal 78 de reactor.

15 En un bloque 154 adicional se comprueba si la conductividad actual es demasiado alta. Si este es el caso, se asume en un bloque 156 un valor P_a preferente para una medida de remedio que debe realizarse. Según este valor preferente se realiza entonces en el bloque 158 una medida asociada. Esta puede consistir en reducir el porcentaje del material biológico en la mezcla, reducir la intensidad de un pretratamiento, reducir la adición de un aditivo conductor o añadir más agua portadora.

20 Si en el bloque 154 se establece que la conductividad no es demasiado grande, se comprueba en un bloque 160 si la conductividad es demasiado pequeña.

Si este es el caso, entonces se asume en un bloque 162 de una parte de programa de orden superior de nuevo un valor P_b preferente, que indica cual de una pluralidad de medidas de remedio previstas debe tomarse.

25 Esta medida puede seleccionarse del siguiente grupo: aumentar el porcentaje de material biológico en la mezcla, pretratamiento más intensivo del material biológico, adición de un aditivo conductor, reducir la cantidad de agua portadora.

En un bloque 164 se realiza entonces la medida correspondiente.

Bucles de regulación similares pueden tener lugar constantemente partiendo del valor de partida del medidor 126 de conductividad y del medidor 128 de conductividad.

30 Si se tiene una instalación con realimentación parcial de cantidades de material, entonces el ajuste de la conductividad correcta en el canal 78 de reactor puede tener lugar también variando de manera adecuada el tamaño de las corrientes de material realimentadas.

35 En cuanto a evitar descargas disruptivas en el reactor de electroporación resulta ventajoso evitar en el mismo todas las condiciones de funcionamiento que podrían conducir a la formación de burbujas de gas o de vapor. Esto significa también que se ajustará en el reactor de electroporación una presión mayor que en reactores de tratamiento aguas arriba, y que se ajustará en el reactor de electroporación también una temperatura, que es mayor que la de en reactores de tratamiento aguas arriba.

Igualmente en cuanto a evitar descargas disruptivas se prestará atención en un pretratamiento del material biológico a que este no contenga puntas o que se redondeen las puntas presentes.

40 La extracción de las sustancias activas o sustancias nocivas puede tener lugar entonces en la etapa 24 de extracción de nuevo de la manera explicada anteriormente.

La etapa de extracción no está limitada al uso de disolventes de extracción. También pueden usarse procedimientos de extracción físicos, que funcionan, por ejemplo, bajo la acción de presión y/o de temperatura.

45 En algunos productos, en una modificación adicional de la invención, también puede ser interesante secar de nuevo un producto liberado de sustancias no deseadas después de la etapa 24 de extracción. Entonces el producto que tiene de nuevo poco líquido también es adecuado para el almacenamiento a largo plazo, sin que proliferen microorganismos en el producto. Sin embargo, el producto tratado sigue teniendo la propiedad, que presenta muchos canales generados durante la electroporación y superficies libres, que en un momento posterior posibilitan un rápido intercambio de sustancias activas con un líquido o un gas.

50 Así, podrían tratarse, por ejemplo, con el procedimiento explicado anteriormente granos de café, que pueden usarse de manera ahorrativa, dado que es posible una transferencia más intensa de las sustancias aromatizantes y de la cafeína al agua de café.

5 A los materiales biológicos que tienen poco líquido típicos, que pueden disgregarse con el procedimiento descrito anteriormente, pertenecen precursores para la industria del perfume (pétalos de rosa, pétalos de lavanda, etc.), precursores para artículos de droguería (acículas de abetos, acículas de pinos carrasco, etc.), precursores para la industria farmacéutica (por ejemplo, hojas de plantas medicinales (eucalipto, menta, melisa, ortiga, flores de tilo), cortezas que contienen sustancias activas, etc. y también raíces, hojas y frutos de plantas medicinales (raíz de gatuña, belladona, digital, etc.) y precursores para la industria alimentaria (especias, frutos secos, lentejas, guisantes, etc.).

Ejemplos típicos de materiales biológicos animales son, por ejemplo, carne (para la obtención de extractos cárnicos) y tejidos para la obtención de hormonas (partes de la corteza de glándulas suprarrenales), etc.

10 Los siguientes ejemplos ofrecen una visión general sobre parámetros de funcionamiento adecuados junto con determinadas materiales vegetales del reactor de electroporación.

Ejemplo 1: Producción de jugo de raíz de gatuña

Se trituraron raíces de gatuña mecánicamente para dar trozos de aproximadamente 5 mm de diámetro.

Los pedazos de raíz así obtenidos se añadieron en una relación de 1:3 con agua a una disolución de mosto.

15 La disolución de mosto se agitó a lo largo de 10 minutos a 19°C.

Se obtiene así una disolución de mosto pretratada con una conductividad eléctrica de 5,9 mS/cm.

Esta disolución de mosto se vertió a un reactor de electroporación, cuyos electrodos rectangulares opuestos entre sí presentaban una separación de 20 mm y longitudes de canto de 4 cm o 13 cm.

20 La disolución de mosto se trató a una intensidad de campo de 12,5 kV/cm con 15 impulsos de campo. Su duración era de 2 µs.

Directamente tras la electroporación se midió una conductividad del mosto de 6,9 mS/cm.

Tras dejar reposar el mosto tras la electroporación a lo largo de 3 horas se decantó el agua y se prensó y se filtró el jugo de raíz.

Su conductividad ascendía a 10,45 mS/cm.

25 El residuo tras el prensado ascendía al 6,15%.

Ejemplo 2: Producción de jugo de flores de tilo

Se añadieron flores de tilo con un diámetro de desde 5 hasta 10 mm en una relación de 1:2 con agua a una disolución de mosto.

La disolución de mosto se agitó a lo largo de 10 minutos a 19°C.

30 Se obtiene así una disolución de mosto pretratada con una conductividad eléctrica de 3,3 mS/cm.

Esta disolución de mosto se vertió a un reactor de electroporación, cuyos electrodos rectangulares opuestos entre sí presentaban una separación de 20 mm y longitudes de canto de 4 cm o 13 cm.

La disolución de mosto se trató a una intensidad de campo de 11,5 kV/cm con 15 impulsos de campo. La duración de los impulsos de campo era de 2 µs.

35 Directamente tras la electroporación se midió una conductividad del mosto de 4,68 mS/cm.

Tras dejar reposar el mosto tras la electroporación a lo largo de 3 horas se decantó el agua y se prensó el jugo.

Su conductividad ascendía a 7,0 mS/cm.

El residuo tras el prensado del jugo ascendía al 3,84%.

40

REIVINDICACIONES

- 1.- Procedimiento para disgregar material biológico, en el que:
- a) el material biológico se distribuye en un medio portador y
 - 5 b) la mezcla de material portador y material biológico se trata mediante electroporación,
caracterizado porque:
 - c) se monitoriza la aparición de descargas disruptivas eléctricas durante el tratamiento de electroporación y
 - d) se controla al menos un parámetro del tratamiento de electroporación en función del resultado de la monitorización.
- 10 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado porque** se monitoriza la aparición de descargas disruptivas mediante la luz generada en las descargas disruptivas.
- 3.- Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, **caracterizado porque** se monitoriza la aparición de descargas disruptivas mediante golpes de presión generados en las descargas disruptivas y/o mediante el sonido generado en las descargas disruptivas.
- 15 4.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado porque** se monitorizan las descargas disruptivas mediante los impulsos de corriente que fluyen a través de la mezcla durante la electroporación y/o mediante los impulsos de tensión que se generan en la mezcla.
- 5.- Procedimiento según la reivindicación 4, **caracterizado porque** se monitoriza la amplitud y/o la longitud de los impulsos de corriente que fluyen durante la electroporación y/o de los impulsos de tensión que se generan en la mezcla.
- 20 6.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado porque** se monitoriza la conductividad de la mezcla mediante la corriente que fluye a través de la mezcla durante la electroporación y/o la caída de tensión en la mezcla.
- 7.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado porque** se mide la conductividad de la mezcla antes de la electroporación.
- 25 8.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado porque** el parámetro controlado se selecciona del siguiente grupo: la intensidad de campo eléctrico, que se mantiene durante la electroporación, la longitud de los impulsos de campo, que se usan durante la electroporación, la separación entre los impulsos de campo, que se usan durante la electroporación, el número total de los impulsos de campo, que se usan durante la electroporación.
- 30 9.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizado porque** el parámetro controlado se selecciona del siguiente grupo: la temperatura de la mezcla durante la realización de la electroporación, la presión, a la que se encuentra la mezcla durante la electroporación, la duración del tratamiento de electroporación.
- 10.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 9, **caracterizado porque** un parámetro controlado es la relación entre material biológico y material portador en la mezcla.
- 35 11.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 10, **caracterizado porque** uno de los parámetros controlados es la intensidad de un pretratamiento, en particular una trituración previa del material biológico.
- 12.- Procedimiento según la reivindicación 11, siendo el material biológico un material biológico que contiene poco o nada de líquido, al que en el pretratamiento se le suministra un líquido de penetración, que proporciona a las células del material biológico una conductividad débil, **caracterizado porque** el parámetro controlado es un parámetro del pretratamiento y se selecciona del siguiente grupo: el tiempo de tratamiento, el tipo y la cantidad de líquido de penetración añadido, la temperatura, a la que se ejecuta el pretratamiento, la presión, a la que se ejecuta el pretratamiento, el tipo y la intensidad de un movimiento que tiene lugar durante el pretratamiento de la mezcla de material biológico y líquido de penetración.
- 40 13.- Procedimiento según la reivindicación 11 o 12, **caracterizado porque** el pretratamiento comprende un pretratamiento mecánico, un pretratamiento químico con un medio de pretratamiento o un pretratamiento físico, caracterizado porque el parámetro controlado se selecciona del siguiente grupo: el tipo y la concentración del medio de pretratamiento, la temperatura del pretratamiento, la intensidad del pretratamiento, el movimiento del material biológico durante el tratamiento previo.
- 45 14.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 13, en el que se realimenta una corriente de material
- 50

desde una etapa de procedimiento hasta una etapa de procedimiento anterior, **caracterizado porque** el parámetro controlado es la cantidad de la corriente de material realimentada.

5 15.- Procedimiento según la reivindicación 14, sometiéndose la corriente de material realimentada a un tratamiento intermedio, **caracterizado porque** el parámetro controlado es la intensidad del tratamiento intermedio, la duración del tratamiento intermedio, el tipo o la concentración de las sustancias auxiliares usadas durante el tratamiento intermedio.

10 16.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 15, **caracterizado porque** en el caso del control de la conductividad mediante una variación de parámetros de este tipo, que reduce la intensidad del tratamiento de electroporación, se reduce la velocidad de transporte de la mezcla y/o se acorta la separación entre impulsos de campo sucesivos y/o se reduce la altura y/o la anchura de los impulsos de campo.

17.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 15, **caracterizado porque** en el caso del control de la conductividad mediante una variación de parámetros, que aumenta la intensidad del tratamiento de electroporación, se aumenta la velocidad de transporte de la mezcla y/o se agranda la separación entre impulsos de campo sucesivos y/o se reduce la altura y/o anchura de los impulsos de campo.

15 18.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 17, **caracterizado porque** se cuenta cuántas descargas disruptivas se producen dentro de un intervalo de tiempo predeterminado, y se toma una medida de emergencia, cuando el número de descargas disruptivas encontrado es mayor que un número de perforaciones admisible máximo.

20 19.- Procedimiento según la reivindicación 18, **caracterizado porque** la medida de emergencia se selecciona del siguiente grupo: desconectar el campo eléctrico durante un periodo de tiempo predeterminado o de manera permanente, expulsar rápidamente, fuera del reactor de electroporación, el volumen de mezcla, que se somete en ese momento a la electroporación, parada por error de la instalación.

20.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 19, añadiéndose además a la mezcla un aditivo que influye en la conductividad, **caracterizado porque** el parámetro controlado es la cantidad del aditivo añadido.

25 21.- Dispositivo para la realización del procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 20, con un reactor (20) de electroporación, que presenta dos electrodos (80, 82) que delimitan al menos parcialmente un canal (78) de tratamiento, que están conectados con un generador (86, 90, 92, 94) de impulsos de alta tensión, **caracterizado porque** está prevista una unidad de detección de perforaciones, que comprende una o varias unidades/medios del siguiente grupo: un sensor (84) de corriente con un discriminador de amplitudes o discriminador de anchuras de impulso actuado por el mismo; una unidad de detección de luz, conectada ópticamente con la cámara (78) de tratamiento; una unidad de detección de presión, conectada en presión con la cámara (78) de tratamiento; un sensor acústico, conectado acústicamente con el canal (78) de tratamiento.

30

35 22.- Dispositivo según la reivindicación 21, **caracterizado porque** presenta una unidad (84; 126; 128) de medición de conductividad, que actúa conjuntamente con la mezcla en el interior del canal (78) de tratamiento o actúa conjuntamente con la mezcla, que se encuentra antes del canal (78) de tratamiento.

40

45

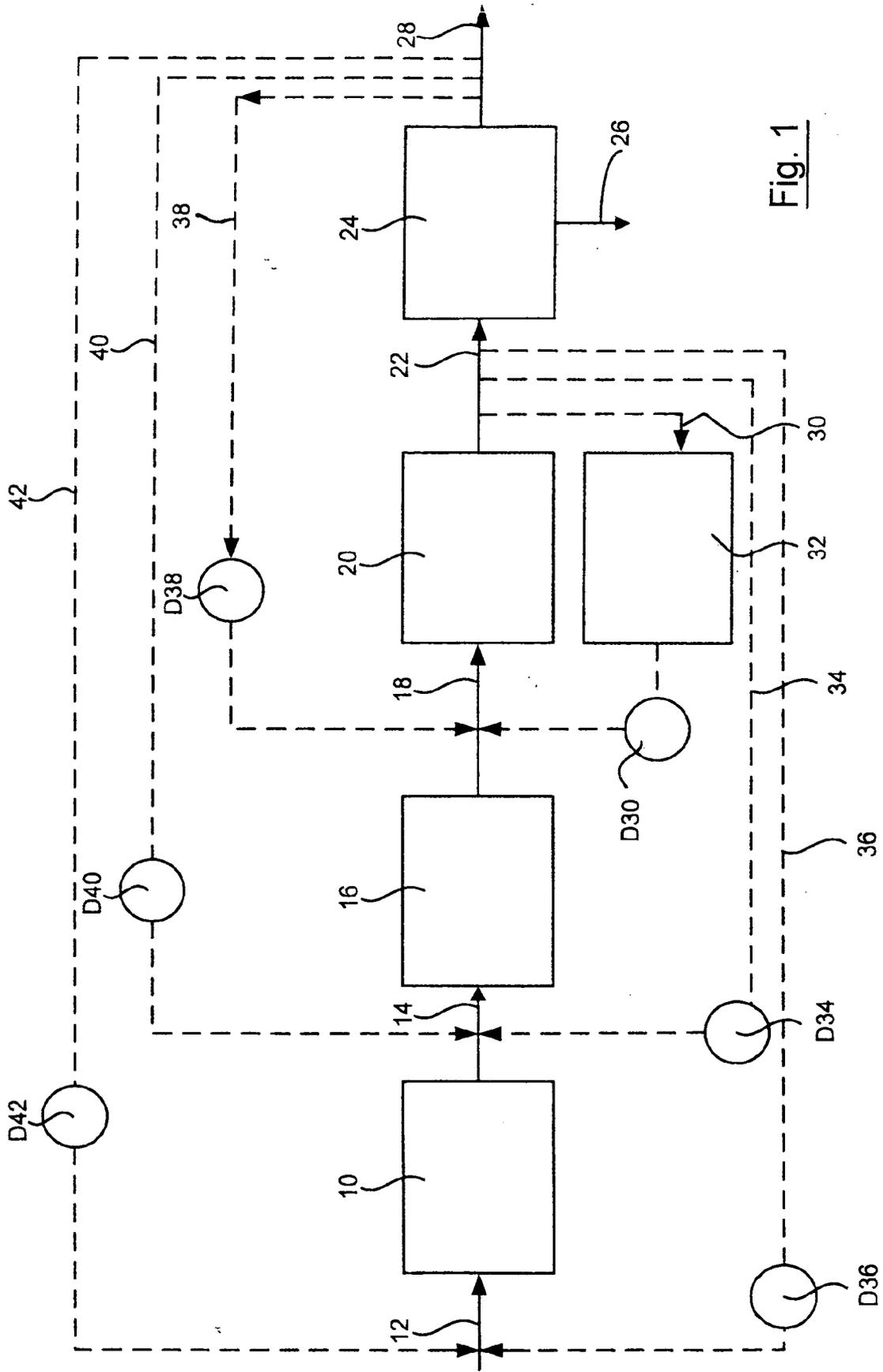


Fig. 1

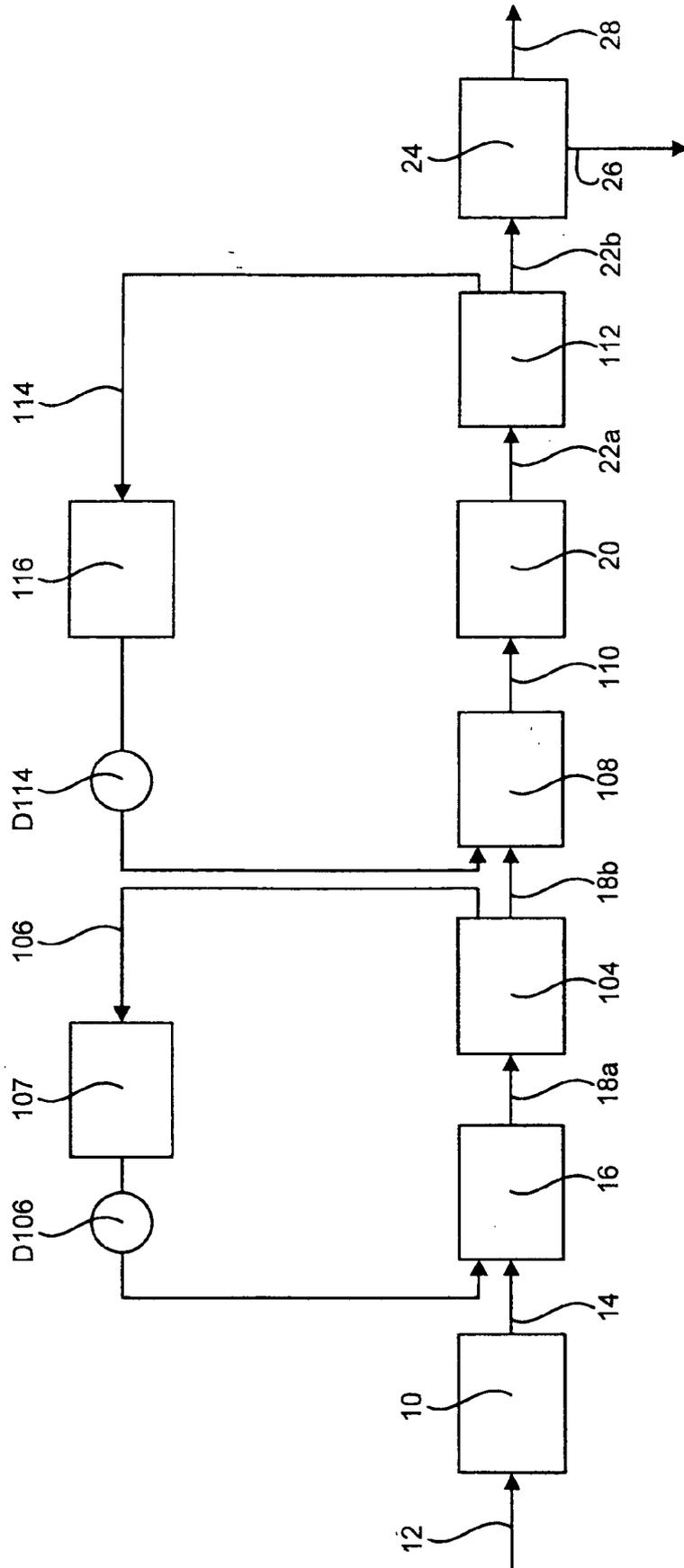


Fig. 3

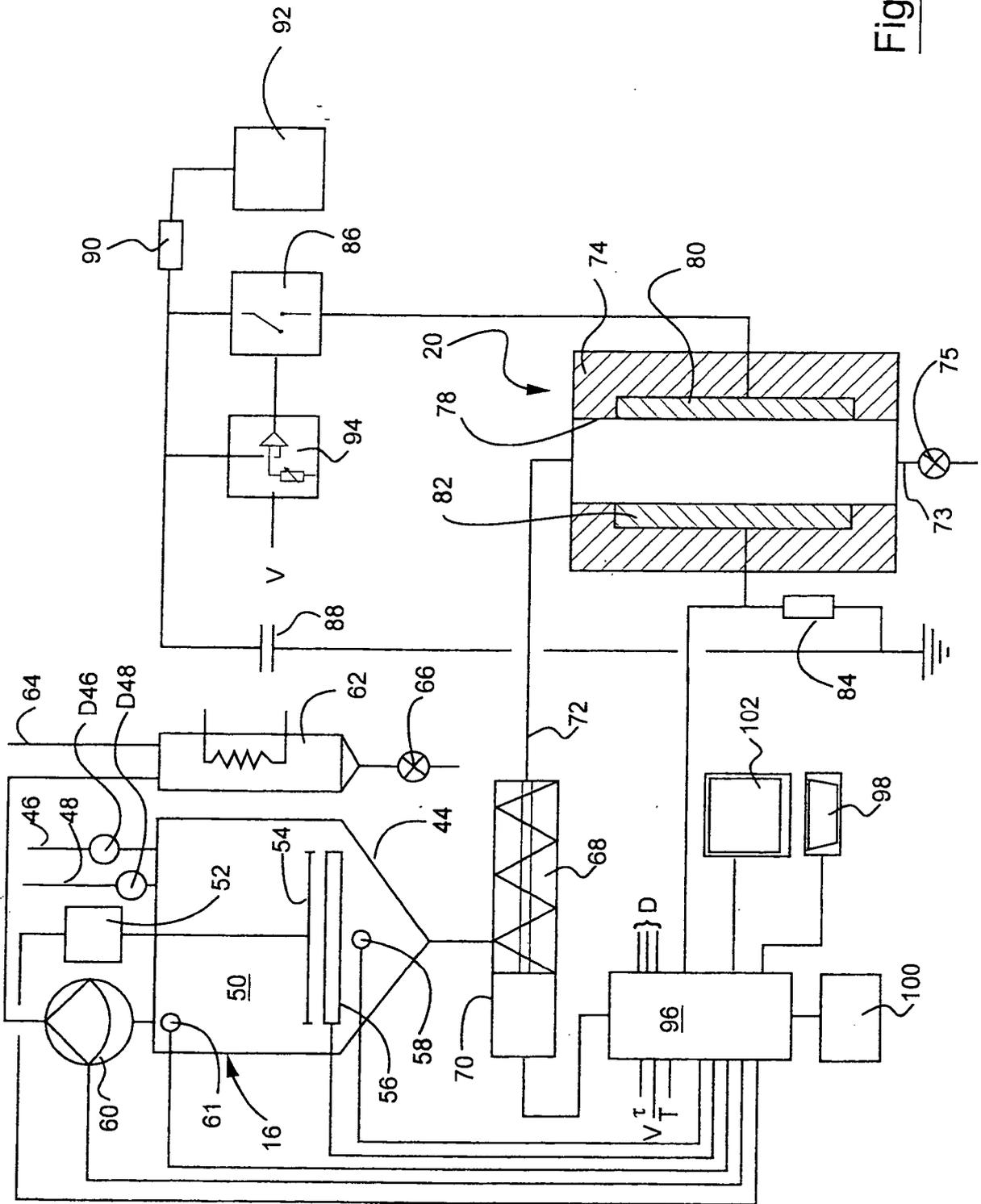


Fig. 4

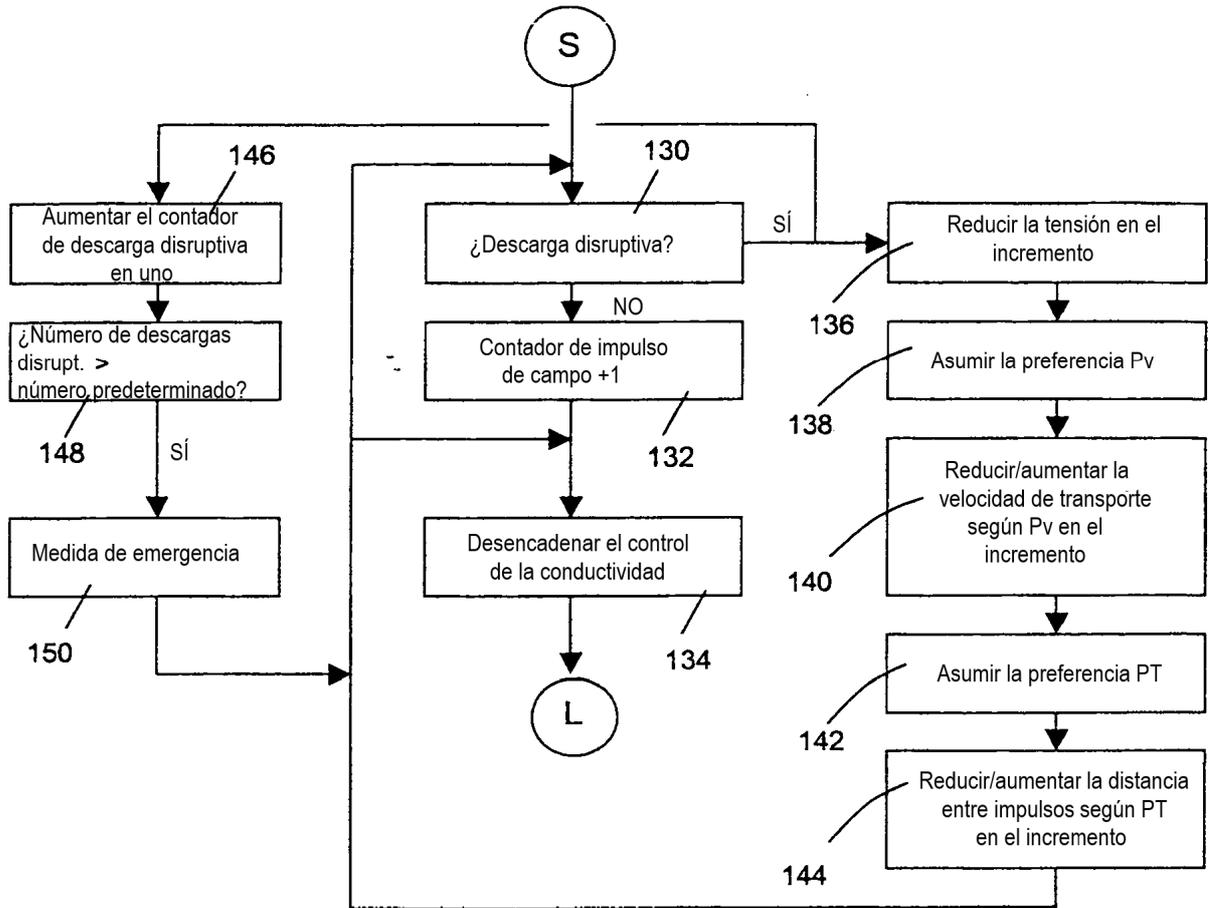


Fig. 6

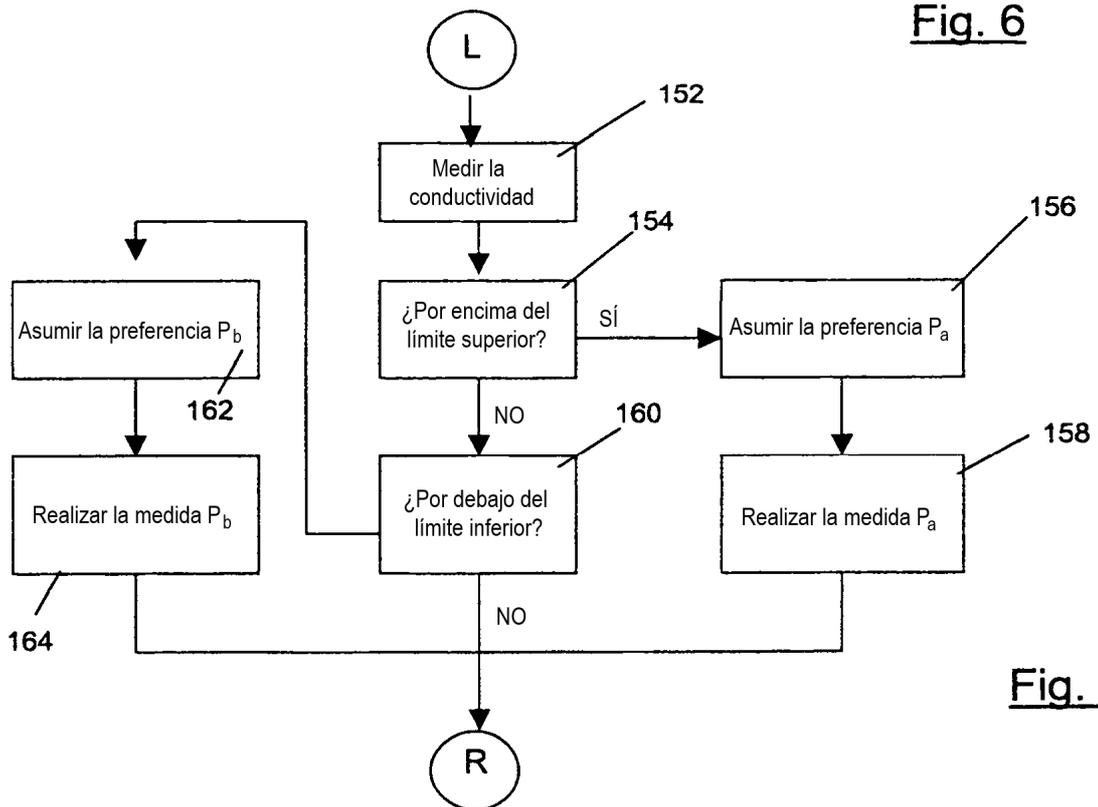


Fig. 7