



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 332 386**

51 Int. Cl.:

**C12P 7/62** (2006.01)

**C08G 63/89** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07729179 .7**

96 Fecha de presentación : **16.05.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **2029759**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **04.03.2009**

54

Título: **Procedimiento para la separación de partículas de polihidroxicanoatos, obtenidas por fermentación, mediante la utilización de un separador de toberas.**

30

Prioridad: **24.05.2006 EP 06114448**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**03.02.2010**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**03.02.2010**

73

Titular/es: **BASF SE**  
**67056 Ludwigshafen, DE**

72

Inventor/es: **Cooper, Bryan;**  
**Schneller, Arnold y**  
**Preishuber-Pflügl, Peter**

74

Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 332 386 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 separación de partículas de polihidroxialcanoatos, obtenidas por fermentación, mediante la utilización de un separador de toberas.

5 La invención se refiere a un procedimiento para el aislamiento de polihidroxialcanoatos a partir de una célula productora.

10 Los polihidroxialcanoatos (PHA) tal como, por ejemplo, el polihidroxibutirato (PHB) pueden ser sintetizados con ayuda de bacterias. De manera ejemplificativa se han descrito en la publicación Biopolymer, Wiley-VCH, 2002 procedimientos biotecnológicos de este tipo.

15 El PHB se presenta, al final de la fermentación en las células bacterianas, en forma de gránulos, que están rodeados por una cubierta proteínica (J. Biol. Chem. 1989, Vol. 264(6), páginas 3286 - 3291). Con el fin de obtener un PHB suficientemente puro, éste tiene que ser separado de las células bacterianas.

20 Las masas en bruto, que son obtenidas por medio de biotecnología, contienen, además del polihidroxialcanoato deseado, los microorganismos que han producido el polihidroxialcanoato (células productoras, biomasa o masa que no es de polihidroxialcanoato). El aislamiento del polihidroxialcanoato a partir de la biomasa puede conseguirse a) por medio de la disolución de la biomasa, b) por medio de la extracción del polihidroxialcanoato en un agente de extracción adecuado o c) por medio de la digestión mecánica de la biomasa (células productoras) y, a continuación, separación de los fragmentos celulares de los gránulos del polihidroxialcanoato (PHA).

25 El método más frecuente, con esta finalidad, está constituido por la extracción de los gránulos de PHA a partir de la biomasa con un disolvente. Como agentes de extracción, que son adecuados para los polihidroxialcanoatos, pueden ser empleados los compuestos clorados (método b)). Se han indicado ejemplos en la publicación EP 0124309 y en la literatura allí citada. Por consiguiente, el empleo de disolventes tiene una serie de inconvenientes. Para la manipulación y para la recuperación del disolvente es necesario invertir en una infraestructura complicada y costosa. La biomasa extraída tiene que liberarse de los restos de disolvente como paso previo a su utilización ulterior como abono o como pienso. Puesto que el PHB se disuelve insuficientemente en muchos disolventes, las cantidades de disolvente, que son necesarias, son muy elevadas.

30 Para la degradación y la disolución de la biomasa (elaboración a)) pueden ser empleados, por ejemplo, enzimas o procedimientos químicos. De manera adicional pueden ser aportados compuestos tensioactivos. Es posible una combinación de varios procedimientos.

En la publicación EP 0145233 se describe la degradación de la biomasa por medio de enzimas.

40 En la publicación WO 94/24302 se describe la degradación de la biomasa por medio de enzimas y de peróxido de hidrógeno.

45 En la publicación US 5110980 se describe la degradación de la biomasa por medio de hipoclorito, lo cual hace que sean accesibles polihidroxialcanoatos con elevado peso molecular. En dicha publicación se investigan diversos parámetros tales como la temperatura, el tiempo o el pH durante el tratamiento con el hipoclorito. No ha sido descrita una purificación del polihidroxialcanoato con ácidos diluidos.

50 Se ha descrito (Research In Microbiology 2005, 156, páginas 865-873) otro método para la liberación del polihidroxibutirato (PHB), que se forma a partir de células de *Escherichia coli*, que están modificadas por medio de la ingeniería genética. En este caso, se conecta aguas abajo una autólisis. Las condiciones exactas para la autólisis no han sido descritas. La autólisis es un procedimiento de autodisolución de las células por medio de enzimas propios. Este método de obtención tiene los siguientes inconvenientes. Puesto que la autólisis transcurre de una manera incompleta y que están adheridos todavía entre sí fragmentos celulares así como gránulos de PHB, únicamente se libera el 80% aproximadamente del PHB formado.

55 La memoria descriptiva de la patente JP 7031488 A divulga un procedimiento para la separación de partículas de polihidroxialcanoato, obtenidas por fermentación, por medio de una etapa de centrifugación, que se acopla con la digestión celular por medio de una homogeneización a alta presión.

60 Por consiguiente, la tarea consistía en encontrar un procedimiento que condujese a una separación completa entre los fragmentos celulares de las células productoras y los gránulos formados de polihidroxialcanoato.

65 Una vez que habían fracasado los ensayos con centrífugas convencionales, se encontró, de manera sorprendente, que los fragmentos celulares podían ser separados de una manera muy eficiente de los gránulos de polihidroxialcanoato por medio de un separador de toberas, que trabaja de manera continua. El pellet, que está constituido por los gránulos de polihidroxialcanoato, es evacuado de manera permanente a través de las toberas, mientras que los segmentos celulares son separados de manera efectiva, permanentemente, en el sobrenadante (de una manera más precisa la "corriente clara"). No existe un vaciado por apertura del tambor y, por consiguiente, tampoco existen pérdidas, arremolinamientos ni inestabilidades similares, que perjudiquen una separación eficiente. Con objeto de conseguir una pureza todavía

## ES 2 332 386 T3

más elevada, los gránulos de PHA pueden ser combinados con agua clara y pueden ser centrifugados de nuevo. De esta forma, se llega a una suspensión acuosa de gránulos de PHA de elevada pureza, cuya suspensión puede ser secada a continuación de manera conocida, por ejemplo por medio de un secado por pulverización. El producto que se obtiene es adecuado para la elaboración ulterior para dar materiales sintéticos termoplásticos. No se requiere el empleo de disolventes.

Por consiguiente, el procedimiento se caracteriza, frente a los procedimientos tradicionales, por medio de una elevada eficiencia, una elevada economía y una excelente procesabilidad.

Los separadores de toberas son así mismo conocidos con la denominación de separador de Westfalia. Puede conseguirse una descripción detallada, por ejemplo, en la dirección [www.gea-westfalia.de](http://www.gea-westfalia.de). De manera ejemplificativa, se ha indicado el sistema VisCon®, en el cual las toberas son controladas por medio de la viscosidad. De este modo, se evita la adaptación de los parámetros del separador (tiempos de vaciado) cuando se modifiquen las condiciones de alimentación y como consecuencia de ello se alcanzan concentraciones en la descarga de materia sólida, que permanecen constantes. En el caso del sistema VisCon® las toberas no yacen sobre el borde del tambor, sino que lo hacen sobre un diámetro menor en el tambor. La introducción a través de la alimentación hidrohérmica así como la descarga a través de las toberas aumenta la actividad celular de las células separadas.

Los aparatos necesarios están técnicamente disponibles y pueden ser extrapolados a voluntad de tal manera que el procedimiento puede ser extrapolado a escala industrial sin problemas.

Una forma de realización especial del procedimiento, de conformidad con la invención, efectúa la digestión mecánica de las células productoras en la etapa i). La digestión exenta de productos químicos tiene ventajas. Se ha descrito que pueden someterse a digestión células de la bacteria *Alcaligenes eutrophus* productora del PHB con ayuda de un homogeneizador (Bioseparation 1991, 2, páginas 155-166). Los gránulos de PHB que están presentes en las células pudieron ser separados por disolución casi por completo de las células después de varios pasajes a través de un homogeneizador. En este tipo de homogeneizador la suspensión celular es prensada a través de una válvula. Por medio de la regulación de la distancia intersticial entre el cono de la válvula y el asiento de la válvula se genera una turbulencia. La suspensión, que sale de la válvula, choca entonces sobre una placa de acero. Por consiguiente la presión de esta máquina está limitada a 1.500 bares.

Para la generación de presiones mayores se requieren grandes cantidades de corriente eléctrica. Una digestión celular con un homogeneizador es especialmente económica cuando las células queden completamente digeridas después de un solo pasaje. El método descrito en la publicación Bioseparation 1991, 2, páginas 155-166, tiene el inconveniente de que se requieren cuatro pasajes a través del homogeneizador.

Ahora hemos observado, de manera sorprendente, que las células que contienen PHA especialmente de *Alcaligenes eutrophus* pueden ser digeridas de una manera muy buena con un homogeneizador a alta presión, tal como el que se describe a continuación. En este caso se digiere más del 99% de las células con un solo pasaje a través del homogeneizador a alta presión, a una presión de 2.000 bares y mayor que este valor y el PHA es liberado casi por completo. Por consiguiente, el objeto de la presente invención está constituido así mismo por la digestión por medio de un homogeneizador a alta presión, que trabaje a presiones de 2.000 atmósferas y mayores que este valor. De manera ejemplificativa, el procedimiento está constituido por la siguiente disposición:

### Ejemplos para dispositivos de homogeneización adecuados

- a) constituidos por un diafragma con, al menos, una tobera de entrada y un diafragma con, al menos, una tobera de salida, llevándose a cabo, en caso dado, un aporte de energía mecánica en el recinto intermedio, que está comprendido entre los diafragmas o
- b) constituidos por un diafragma con, al menos, una tobera de entrada y una placa deflectora, llevándose a cabo, en caso dado, un aporte de energía mecánica en el recinto intermedio, que está comprendido entre el diafragma y la placa deflectora.

### Forma de realización a)

El dispositivo de homogeneización destinado al aislamiento de los polihidroxialcanoatos está constituido, por ejemplo, por un diafragma con, al menos, una tobera de entrada y por un diafragma con, al menos, una tobera de salida, estando dispuestas las toberas axialmente entre sí. En el recinto intermedio, que está comprendido entre los diafragmas, puede encontrarse un mezclador estático. En caso dado, se verifica en el recinto intermedio de manera adicional un aporte de energía mecánica.

Los diafragmas, que pueden ser empleados de conformidad con el procedimiento según la invención, presentan, al menos, un orificio, es decir al menos una tobera. En este caso, los dos diafragmas pueden presentar respectivamente un número arbitrario de orificios, pero de manera preferente no presentan respectivamente más de 5 orificios, de forma especialmente preferente no presentan respectivamente más de tres orificios, de manera muy especialmente preferente no presentan respectivamente más de dos orificios y, de manera especialmente preferente, no presentan respectivamente más que un orificio. Los dos diafragmas pueden presentar un número de orificios diferente o pueden

## ES 2 332 386 T3

presentar el mismo número de orificios, de manera preferente ambos diafragmas tienen el mismo número de orificios. En general, los diafragmas están constituidos por placas perforadas con, al menos, un orificio en cada una de ellas.

5 En otra forma de realización de este procedimiento, de conformidad con la invención, el segundo diafragma está reemplazado por un tamiz, es decir que el segundo diafragma tiene una pluralidad de orificios o bien de toberas. Los tamices que pueden ser empleados pueden cubrir un gran intervalo de los tamaños de los poros, por regla general los tamaños de los poros se encuentran comprendidos entre 0,1 y 250  $\mu\text{m}$ , de manera preferente se encuentran comprendidos entre 0,2 y 200  $\mu\text{m}$ , de manera especialmente preferente se encuentran comprendidos entre 0,3 y 150  $\mu\text{m}$  y, de manera especial, se encuentran comprendidos entre 0,5 y 100  $\mu\text{m}$ .

15 Los orificios o bien las toberas pueden tener cualquier forma geométrica imaginable, por ejemplo pueden ser circulares, ovaladas, poligonales con un número arbitrario de vértices que, en caso dado, también pueden estar redondeados, o incluso pueden tener forma de estrella. De manera preferente, los orificios tienen una forma circular.

20 Los orificios del diafragma de entrada tienen, por regla general, un diámetro comprendido entre 0,05 mm y 1 cm, de manera preferente comprendido entre 0,08 mm y 0,8 mm, de manera especialmente preferente entre 0,1 y 0,5 mm y, de manera especial, entre 0,2 y 0,4 mm. Los orificios del diafragma de salida tienen, por regla general, un diámetro comprendido entre 0,5 mm y 1 cm, de manera preferente comprendido entre 5 mm y 50 mm, de manera especialmente preferente comprendido entre 10 y 20 mm.

25 De manera preferente, los dos diafragmas están contruidos de tal manera, que los orificios, o bien que las toberas, estén dispuestos axialmente entre sí. Se entenderá por disposición axial que es idéntico el sentido de flujo de los dos diafragmas, generado por medio de la geometría del orificio de la tobera. Con esta finalidad no tienen que encontrarse en una línea los sentidos de apertura de las toberas de entrada y de salida, pudiendo estar incluso desplazados paralelamente, tal como se desprende de las realizaciones precedentes. De manera preferente, los diafragmas están orientados de manera paralela.

30 Sin embargo son posibles otras geometrías, especialmente diafragmas no paralelos u orientaciones diferentes de apertura de las toberas de entrada y de salida. En el sistema de dos diafragmas (diafragma de entrada y diafragma de salida) la tobera de salida presenta, como se ha indicado precedentemente, orificios mayores. De este modo, se produce un apaciguamiento de la turbulencia. En este caso no se requiere una chapa deflectora.

35 El espesor de los diafragmas puede ser arbitrario. De manera preferente, los diafragmas tienen un espesor situado en el intervalo comprendido entre 0,1 y 100 mm, de manera preferente tienen un espesor comprendido entre 0,5 y 30 mm y, de manera especialmente preferente, comprendido entre 1 y 10 mm. En este caso, el espesor (l) de los diafragmas se elige de tal manera que el cociente entre el diámetro (d) de los orificios y el espesor (l) se encuentre en el intervalo de 1 : 1, de manera preferente de 1 : 1,5 y, de manera especialmente preferente, de 1 : 2.

40 El recinto intermedio, que está comprendido entre los dos diafragmas, puede tener una longitud arbitraria, por regla general la longitud del recinto intermedio está comprendida entre 1 y 500 mm, de manera preferente está comprendida entre 10 y 300 mm y, de manera especialmente preferente, está comprendida entre 20 y 100 mm.

45 En el recinto intermedio, que está comprendido entre los diafragmas, puede encontrarse un mezclador estático, que puede llenar por completo o en parte el tramo que está comprendido entre los dos diafragmas. De manera preferente, el mezclador estático se extiende a lo largo de toda la longitud del recinto intermedio, que está comprendido entre los dos diafragmas. Los mezcladores estáticos son conocidos por el técnico en la materia. En este caso puede tratarse, por ejemplo, de un mezclador de válvula o puede tratarse de un mezclador estático con taladros, puede tratarse de un mezclador constituido por laminillas corrugadas o puede tratarse de un mezclador constituido por nervaduras, que engranan entre sí. Por otra parte, puede tratarse de un mezclador estático en forma de espiral o en forma de N o puede tratarse de un mezclador de este tipo con un elemento mezclador que puede ser calentado o que puede ser refrigerado.

55 Así mismo, puede verificarse en el recinto intermedio, que está comprendido entre los dos diafragmas, un aporte de energía mecánica, de manera adicional al mezclador estático. La energía puede ser aplicada, por ejemplo, en forma de oscilaciones mecánicas, en forma de ultrasonidos o en forma de energía de rotación. De este modo, se genera un flujo turbulento que hace que las partículas no se aglomeren en el recinto intermedio.

60 Forma de realización b)

65 De forma alternativa a la de esta primera variante, el dispositivo mezclador puede estar constituido por un diafragma con, al menos, una tobera de entrada y con una placa deflectora, encontrándose en el recinto intermedio, que está comprendido entre el diafragma y la placa deflectora, en caso dado, un mezclador estático. De manera alternativa, o adicional, al mezclador estático puede llevarse a cabo en el recinto intermedio un aporte de energía mecánica.

Lo que se ha dicho precedentemente es válido para el diafragma con tobera de entrada, con recinto intermedio, que comprende un mezclador estático, y para el aporte de la energía mecánica.

## ES 2 332 386 T3

En esta variante se substituye el segundo diafragma por una placa deflectora. La placa deflectora tiene, por regla general, un diámetro que es menor entre un 0,5 y un 20%, de manera preferente entre un 1 y un 10%, que el diámetro del tubo en el punto en el que está montada la placa deflectora.

5 En general, la placa deflectora puede tener cualquier forma geométrica, de manera preferente puede tener forma de un disco redondo de tal manera, que en vista de frente se vea un intersticio anular. De manera ejemplificativa, puede imaginarse también la forma de una ranura o de un canal.

10 La placa deflectora puede estar dispuesta, de manera análoga a la del segundo diafragma, en la variante que ha sido descrita precedentemente, a distancias diferentes con respecto al primer diafragma. De este modo, el recinto intermedio, que está comprendido entre el diafragma y la placa deflectora, tiene una longitud arbitraria, por regla general la longitud del recinto intermedio está comprendida entre 1 y 500 mm, de manera preferente entre 10 y 300 mm y, de manera especialmente preferente, entre 20 y 100 mm.

15 El procedimiento, de conformidad con la invención, presenta algunas ventajas frente a las de los procedimientos que son conocidos por el estado de la técnica, puesto que pueden conseguirse rendimientos especialmente elevados del polihidroxicanoato con elevado peso molecular. De manera especial, con esta variante de elaboración pueden realizarse polihidroxicanoatos con un Mn comprendido entre 50.000 y 2.000.000 y, de manera especial, comprendido entre 100.000 y 200.000.

20 La temperatura, a la que se lleva a cabo la emulsificación de la emulsión en bruto para formar la emulsión finamente dividida de conformidad con el procedimiento según la invención, se encuentra situada, por regla general, entre 0 y 150°C, de manera preferente se encuentra entre 5 y 80°C, de manera especialmente preferente se encuentra entre 20 y 40°C. En este caso pueden termostatarse todas las unidades de homogeneización que son empleadas en el dispositivo.

25 La homogeneización se lleva a cabo, por regla general, a presiones situadas por encima de la presión atmosférica, es decir > 1 bar. Sin embargo, las presiones no sobrepasan en este caso un valor de 10.000 bares de tal manera, que se regulan presiones de homogeneización preferentes > 1 bar hasta 10.000 bares, de manera preferente entre 5 y 2.500 bares y, de manera especialmente preferente, entre 100 y 2.000 bares.

30 Las concentraciones de las células productoras, que son empleadas en el procedimiento de conformidad con la invención, están comprendidas aproximadamente desde 20 hasta 300 g/l, de manera preferente están comprendidas entre 50 y 220 g/l.

35 En este caso, se denominan células productoras a cualquier tipo de células o de conjunto de células; especialmente aquellas células de origen animal, vegetal o microbiano. De igual modo, son preferentes las células productoras de organismos recombinantes. Las células productoras adecuadas de una manera especialmente buena son los procariotas (con inclusión de las arqueas) o los eucariotas, de manera especial las bacterias con inclusión de las halobacterias y de los metanococos, los hongos, las células de insectos, las células vegetales y las células de mamíferos, de manera especialmente preferente *Alcaligenes eutrophus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Pichia pastoris*, *Pseudomonas spec.*, *Lactobacillen*, *Hansenula polymorpha*, *Trichoderma reesei*, SF9 (o bien células emparentadas). El microorganismo *Alcaligenes eutrophus* es especialmente preferente.

45 La célula productora puede ser empleada en el procedimiento de conformidad con la invención directamente después del cultivo (por ejemplo la fermentación); sin embargo es posible, también, destruir la célula productora sólo por medio de una esterilización, por ejemplo, y, en caso dado, enriquecer la masa celular por medio de una filtración del medio de cultivo.

50 Se entienden por polihidroxicanoatos aquellos polímeros que son preparados por medio de la biotecnología. Entre estos polihidroxicanoatos deben entenderse, de manera especial: el poli-3-hidroxibutirato (P-3HB), el poli-3-hidroxibutirato/co-3-hidroxivalerato (P-3HBco-3HV), el poli-3-hidroxibutirato/co-4-hidroxibutirato (P-3HB-co-4HB), el poli-3-hidroxibutirato/co-3-hidroxihexanoato (P-3HB-co-3HHx) y el poli-3-hidroxibutirato/co-3-hidroxiocetanoato (P-3HB-co-3HO).

55 *Aparatos empleados*

60 En el ejemplo se eligió como homogeneizador a alta presión, para la digestión de las células productoras, el equipo I siguiente: como tobera de entrada se utilizó un diafragma con 14 taladros de 0,2 mm de espesor. El caldo de fermentación se presentó en forma de suspensión y se comprimió a través del diafragma con una presión de 2.000 atmósferas aproximadamente. En el recinto intermedio (longitud 15 mm y diámetro de 8 mm) se arremolinó la suspensión, como paso previo a su encuentro con el segundo diafragma, que actuaba como tobera de salida. La suspensión celular se guió a través de un taladro cónico hasta el diafragma de salida y a continuación salió a través de un solo taladro (diámetro 1,5 mm) del bloque de los diafragmas. El diafragma de salida estaba dispuesto de manera centrada frente a los taladros de la tobera de entrada.

65 Como separador de tobera se utilizó un dispositivo de la firma GEA Westfalia tipo HFC-15.

## ES 2 332 386 T3

### Ejemplo 1

#### *Aislamiento del 3-hidroxi-polihidroxibutirato (3-PHB) a partir de células productoras de Alcaligenes eutrophus*

##### 5 i) *Fermentación del 3-hidroxipolihidroxibutirato en células productoras de Alcaligenes eutrophus*

La fermentación se llevó a cabo según la publicación de los autores Kim, Lee, Lee, Chang, Chang y Woo en *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 43, páginas 892-898 (1994).

##### 10 ii) *Digestión de las células y separación de los gránulos de 3-PHB*

15 Se cargaron en el fermentador 3.300 litros de caldo de fermentación de *Alcaligenes eutrophus* con un contenido de 90 g/l de biomasa seca, el 80% del cual era PHB, una vez concluida la fermentación a 2°C. El caldo se conduce a continuación a través de un homogeneizador a alta presión I a una presión de 2.000 bares. Puesto que la presión tuvo que establecerse previamente, se acumularon los primeros litros de caldo separados y se reciclaron al fermentador. El caldo de fermentación se hizo pasar, en su totalidad, a través del homogeneizador a alta presión.

20 La actividad de la digestión celular se midió por medio de la distribución en placas de los caldos de fermentación antes y después de la digestión, sobre un agar nutriente adecuado. El número de células vivas fue, antes de la digestión, de  $5 \times 10^{10}$  cfu/ml (= 100%). Después de la digestión el número de células vivas se determinó de la misma manera. Este número era de  $5 \times 10^5$  cfu/ml. Esto corresponde a una actividad de la digestión a alta presión del 99,99%.

25 El homogeneizado celular se condujo a continuación a través de un separador de toberas de la firma GEA Westfalia tipo HFC-15. El material, que había sido separado por medio de las fuerzas centrífugas (concentrado) se acumuló independientemente de los detritos celulares, que no se habían separado (sobrenadante). Se determinaron, respectivamente, la substancia seca total y la concentración en PHB (para los resultados véase la tabla más adelante). El concentrado se diluyó con agua completamente desionizada hasta el volumen de partida inicial y se centrifugó de nuevo. El proceso se repitió una vez más.

##### 30 iii) *Secado de los gránulos de 3-PHB*

35 La suspensión de 3-PHB, obtenida en ii), se sometió a un secado por pulverización en un secadero por pulverización convencional. El gas para el secado era nitrógeno con una temperatura de entrada del gas de 200°C, una temperatura de salida del gas de 90°C. La suspensión de PHB se inyectó con ayuda de una tobera para dos productos. El producto seco se separó de la corriente gaseosa por medio de una esclusa de rueda dentada. Los resultados del ensayo están indicados en la tabla siguiente.

40

(Tabla pasa página siguiente)

45

50

55

60

65

Fracción	Masa total	Concentración de substancia seca [g/kg]	Masa total de la substancia seca [kg]	Concentración de 3-PHB [g/kg]	Masa total de 3-PHB [kg]	Proporción de 3-PHB [g/g]
Caldo de fermentación	3300	80	264	64	211	0,800
Homogeneizado	3400	77,6	264	62,1	211	0,800
Primer concentrado	780	284,2	221,7	270	211	0,950
Primer sobrenadante	2620	16,15	42,3	0	0	0,000
Segundo concentrado	770	276,8	213,1	274	211	0,990
Segundo sobrenadante	2630	3,3	8,6	0	0	0,000
Tercer concentrado	760	277,6	211	277,5	210,9	0,999
Tercer sobrenadante	2640	0,80	2,1	0	0	0,000
Secado por pulverización	215,2	980	210,9	980	210,9	0,999

**REIVINDICACIONES**

5 1. Procedimiento para el aislamiento de polihidroxicanoatos a partir de células productoras, **caracterizado** por-  
que

- i) las células protectoras son sometidas a una digestión y, a continuación
- 10 ii) se separan los fragmentos celulares de los gránulos de polihidroxicanoato por medio de un separador de toberas, que trabaja de manera continua.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque las células productoras son sometidas a una digestión en la etapa i) por medio de un dispositivo de homogeneización a alta presión.

15 3. Procedimiento según la reivindicación 2, **caracterizado** porque el dispositivo de homogeneización

- a) está constituido por un diafragma con, al menos, una tobera de entrada y por un diafragma con, al menos, una tobera de salida, verificándose en el recinto intermedio, que está comprendido entre los diafragmas, en caso dado, además un aporte de energía mecánica o
- 20 b) está constituido por un diafragma con, al menos, una tobera de entrada y una placa deflectora, verificándose en el recinto intermedio, que está comprendido entre el diafragma y la placa deflectora, en caso dado, un aporte de energía mecánica.

25 4. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la célula productora está constituida por un organismo recombinante.

5. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el polihidroxicanoato está constituido por un poli-3-hidroxi-  
30 butirato (P-3HB), un poli-3-hidroxi-  
butirato/co-3-hidroxi-  
valerato (P-3HB-co-3HV), un poli-3-hidroxi-  
butirato/co-4-hidroxi-  
butirato (P-3HB-co-4HB), un poli-3-hidroxi-  
butirato/co-3-hidroxi-  
hexanoato (P-3HB-co-3HHx) o un poli-3-hidroxi-  
butirato/co-3-hidroxi-  
octanoato (P-3HB-co-3HO).

6. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la célula productora es destruida como paso previo a la homogeneización.

35

40

45

50

55

60

65