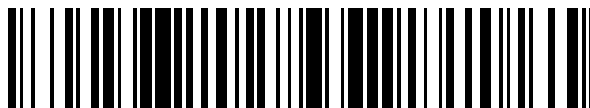


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 611 958**

21 Número de solicitud: 201730479

51 Int. Cl.:

C12N 5/04 (2006.01)

C12M 1/00 (2006.01)

C12M 3/00 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

30.03.2017

43 Fecha de publicación de la solicitud:

11.05.2017

Fecha de concesión:

10.10.2017

45 Fecha de publicación de la concesión:

18.10.2017

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE ALICANTE (100.0%)
CARRETERA SAN VICENTE DEL RASPEIG, S/N
03690 SAN VICENTE DEL RASPEIG (Alicante) ES**

72 Inventor/es:

**BRU MARTINEZ, Roque y
VERA URBINA, Juan Carlos**

54 Título: **BIORREACTOR TIPO COLUMNA DE BURBUJEO PARA CULTIVO DE CÉLULAS VEGETALES EN SUSPENSIÓN**

57 Resumen:

La presente invención se refiere a un biorreactor tipo columna de burbujeo para realizar, en condiciones asépticas, el cultivo de células vegetales en suspensión, cuyas características de diseño permiten además, recuperar el medio de cultivo, sustituirlo por otro medio de cultivo y reutilizar la biomasa remanente en el mismo para una siguiente operación de cultivo.

El biorreactor comprende tres partes principales, cuerpo, tapa y soporte, que deben ensamblarse, esterilizarse y conectarse a una línea de aire estéril libre de aceite por minuto para su funcionamiento.

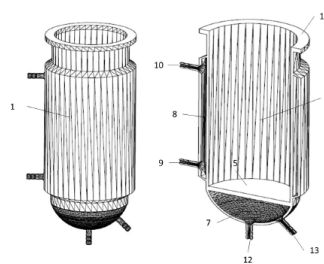


FIGURA 1

ES 2 611 958 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 40.2.8 LP 11/1986.

DESCRIPCIÓN

Biorreactor tipo columna de burbujeo para cultivo de células vegetales en suspensión.

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un producto consistente en un biorreactor para llevar a cabo, en condiciones asépticas, el cultivo de células vegetales en suspensión, cuyas características de diseño permiten además, recuperar el medio de cultivo, sustituirlo por otro medio de cultivo y reutilizar la biomasa remanente en el mismo para una siguiente operación de cultivo.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

El uso de biorreactores está ampliamente extendido para el cultivo de microorganismos (bacterias, hongos filamentosos, etc.) tanto a escala de laboratorio como a escala industrial. Sin embargo, las características de su diseño, típicamente de tanque agitado por dispositivos mecánicos, no siempre son aptas u óptimas para el cultivo de células vegetales. Ello se debe especialmente a que muestran bastante sensibilidad al estrés por cizalla, presentan baja demanda de oxígeno (cerca de $1\mu\text{mol O}_2$ a 10^{-6} células), baja tasa crecimiento (tiempo de duplicación 25 a 110h) y frecuentemente se presentan como agregados grandes, de 2-4 mm de diámetro (Rao, R. S. y Ravishankar, G. A. (2002). Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. Biotechnol Adv. 20: 101-153).

Para diseñar un biorreactor apropiado para un bioproceso particular, es necesario conocer el sistema biológico, tanto su patrón de crecimiento celular como su metabolismo y los factores que influyen sobre ellos para entender el requerimiento de las células sobre su medio ambiente físico y químico.

Además, es necesario optimizar y controlar los parámetros de operación del biorreactor como la concentración de oxígeno disuelto, pH, temperatura, mezclado y el suplemento de nutrientes con la finalidad de favorecer las funciones deseadas tanto para el mantenimiento de las células como para la producción del metabolito.

Diferentes diseños de biorreactor se han mostrado aptos para el cultivo de células y tejidos vegetales, siendo los de agitación neumática tipo columna de burbujeo y tipo airlift los más apropiados para el cultivo de células en suspensión. Sin embargo, un problema que presentan es la necesidad de una aireación homogénea y constante.

En cuanto a los materiales de construcción hay una tendencia en los últimos años al uso de plásticos especiales para la fabricación de vasos de fermentación de un solo uso, sin embargo, los altos costes de consumibles sólo se justifican si el producto obtenido es de un alto valor, por ello, sólo se ha generalizado para la producción de biofármacos (anticuerpos, vacunas, proteínas terapéuticas) mediante el cultivo de células de mamíferos e insectos.

Las células vegetales se han cultivado para producir biomasa con diversas aplicaciones y también compuestos naturales excretados al medio de cultivo. En ambos casos, el proceso puede requerir el cambio de la composición química del medio, que se hace efectiva por sustitución del medio, incluso más de una vez, lo que supone un problema importante porque esto puede requerir una manipulación del cultivo incluso fuera del biorreactor incrementándose mucho el riesgo de contaminación y pérdida del cultivo.

Con el fin de abordar este problema, se estudiaron los requerimientos básicos para el cultivo de células de vid y para la producción del compuesto bioactivo *trans*-resveratrol en un biorreactor comercial de agitación mecánica. En base a ello se diseñó y construyó un prototipo de biorreactor de bajo coste de agitación neumática por burbujeo con forma de cono invertido y se llevó a cabo un estudio comparativo con uno comercial (Vera-Urbina, J.C.; Sellés-Marchart, S.; Martínez-Esteso, M.J.; Pedreño, M.A. and Bru-Martinez, R. (2013) Production of grapevine cell biomass (*Vitis vinifera* L. Gamay) and resveratrol in custom and commercial bioreactors using cyclodextrins and methyl jasmonate elicitors. In. Resveratrol: Sources, Production, and Health Benefits. Editor: Dominique Delmas pp19-39 Nova Science Publishers, Inc.). Los resultados obtenidos demuestran la viabilidad del escalado de matraces a biorreactores de bajo coste, pero sobretodo ponen de manifiesto claras limitaciones en la producción de biomasa y de compuestos bioactivos, debido a las carencias del diseño. En particular, este diseño no podía satisfacer la demanda de oxígeno del cultivo a altas densidades celulares que se dan en etapas avanzadas del ciclo de crecimiento así como en condiciones de producción del metabolito por elicitación.

Por todo lo anteriormente expuesto, se hace necesaria la realización de un nuevo diseño de biorreactor que presente las características óptimas para cultivo de células vegetales y que supere las limitaciones en producción de biomasa y compuestos bioactivos, para los cuales el cambio de medio de cultivo sea un requisito.

La invención se refiere al diseño de un nuevo biorreactor para el crecimiento de células vegetales en condiciones asépticas en suspensión en un medio líquido cuya composición satisface los requerimientos nutricionales y fisiológicos de las células y que es capaz de mantener unas condiciones fisicoquímicas apropiadas.

5

El prototipo se ha realizado para pruebas a escala de laboratorio, por lo que el tamaño del mismo se ha limitado por la restricción que imponen las dimensiones de los equipos estándar de esterilización de laboratorio.

10 El biorreactor es de 7 litros con geometría cilíndrica y agitación neumática por burbujeo apto para llevar a cabo el cultivo de suspensiones celulares vegetales, apto para la recuperación y sustitución del medio de cultivo y apto para la reutilización de la biomasa, todo ello en un entorno aséptico permanente.

15 Los materiales reutilizables, como vidrio y metal, con diseños de agitación neumática son los más apropiados para cultivo de células vegetales.

El biorreactor se compone de tres partes principales ensambladas y esterilizadas que son las siguientes:

- 20
- Cuerpo: recipiente de sección transversal circular con paredes rectas que comprende al menos dos partes, una parte cilíndrica y una esférica.
 - Tapa: pieza de forma cilíndrica que cierra la parte superior abierta del cuerpo.
 - Soporte: pieza que permite la sujeción del cuerpo y la tapa.

Caracterizado porque el cuerpo comprende una base porosa que separa las dos partes del mismo, la parte cilíndrica y la esférica, permitiendo el flujo de fluidos de forma constante y uniforme entre ambas partes (pero no de partículas de tamaño superior al del poro) y comprende también al menos dos orificios entubados, uno de ellos conectado a una línea de aire estéril libre de aceite con flujo regulable y otro para que circulen líquidos o gases; para poder así suministrar aire al cultivo celular y realizar la agitación neumática del mismo manteniendo su homogeneidad y una eficaz transferencia de masa. Además, la tapa comprende al menos orificios para llenado, trasvase del cultivo y entrada/salida de gases lo que permite el cambio de medio en el biorreactor en condiciones asépticas.

25

30

En una realización en particular, el cuerpo comprende una pluralidad de orificios entubados para la conexión de tubos flexibles y la entrada y salida de fluidos.

35

En una realización en particular, el cuerpo, en su parte cilíndrica, comprende una doble pared que está rematada con un reborde horizontal que permite el apoyo del cuerpo en el soporte y de la tapa sobre el cuerpo para el cierre hermético del biorreactor.

- 5 En una realización en particular, el cuerpo, en la doble pared de la parte cilíndrica, comprende al menos un orificio entubado de entrada y otro de salida para que circule un líquido atemperado y así, intercambiar calor con el cultivo y mantener constante su temperatura. En cualquier caso, la temperatura puede mantenerse ambiente por otros medios.

10

En una realización en particular, el cuerpo es transparente u opaco.

En una realización en particular, el cuerpo es de vidrio o de acero.

- 15 En una realización en particular, la tapa tiene una pluralidad de orificios para poder fijarla al soporte y acoplar accesorios, como tapón, tubos de muestreo y llenado.

En una realización en particular, la tapa es de acero inoxidable.

- 20 En una realización en particular, el soporte es una pieza que comprende al menos cuatro tubos, en disposición paralela equidistante, soldados en el extremo de apoyo al suelo, a un tubo en forma de circunferencia incompleta y por el otro, a un aro macizo con orificios que permiten el acople con la tapa.

- 25 En una realización en particular, el soporte es de acero inoxidable.

En una realización en particular, el biorreactor se conecta a reservorios para el intercambio de líquido. Estos reservorios se conectan mediante tubos flexibles de silicona autoclavables con las entradas y salidas del biorreactor. Mediante derivación de los tubos y válvulas, el
30 flujo de aire puede entrar por la base del cuerpo del biorreactor para airear el cultivo, o por la tapa, produciéndose en este caso el vaciado del líquido hacia un reservorio vacío. Reconfigurando la línea de nuevo con las válvulas, el medio contenido en un reservorio lleno puede ser empujado por presión hacia el biorreactor y, entrando por la base, dar lugar al llenado del mismo. Son imprescindibles para realizar las operaciones de extracción y/o
35 sustitución de medio de cultivo para las cuales se ha ideado específicamente este diseño.

En una realización en particular, el biorreactor se conecta con un dispositivo de toma aséptica de muestras. Este dispositivo puede ser de fabricación casera o comercial y sólo necesita conectarse al tubo de toma de muestras ensamblado en la tapa.

5 La invención aporta una serie de ventajas:

- Diseño adaptado a las necesidades del cultivo de células vegetales en suspensión.
- Reducción de coste estructural frente a modelos comerciales de tanque agitado o airlift de tamaño similar: cualquier dispositivo/sensor no imprescindible se elimina (ej. pH stato).
- 10 • Reducción de coste operacional frente a modelos de un solo uso, especialmente apto para la obtención de productos (biomasa y/o metabolitos) de valor comercial bajo o moderado.
- Posibilidad de cambio de medio y reutilización de biomasa asépticamente sin necesidad de un entorno aséptico (ej. cabina de flujo laminar).

15

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Para completar la descripción que se está realizando y con objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características de la invención, se acompaña como parte integrante de dicha descripción, las siguientes figuras con carácter ilustrativo y no limitativo, que
20 representan lo siguiente:

FIGURA 1: Diseño del cuerpo del biorreactor: vista exterior y sección mostrando el diseño interior.

FIGURA 2: Diseño de la tapa del biorreactor.

25 FIGURA 3: Diseño del soporte del biorreactor.

FIGURA 4: Partes del biorreactor ensambladas.

FIGURA 5: Reservorio para intercambio de líquidos con el biorreactor.

EXPOSICIÓN DETALLADA DE MODOS DE REALIZACIÓN

30 Para una mejor comprensión de la invención, se ha desarrollado la descripción detallada de las partes que componen las distintas configuraciones que se presentan.

Según se aprecia en la figura 1, el biorreactor 4 comprende las siguientes partes:

- **Cuerpo 1:** recipiente hueco de una sola pieza de sección circular con paredes rectas
35 y de fondo curvo, es decir forma cilíndrica hueca como un casquete esférico hueco.

El cuerpo comprende la parte cilíndrica 6 y la esférica 7, separadas internamente por la base porosa 5, de vidrio o acero, delimitando así las dos partes antes mencionadas, cuya porosidad permite el flujo de fluidos entre ellas, pero no de partículas de tamaño mayor al del poro. La parte cilíndrica 6 tiene doble pared para delimitar el compartimento 8 con orificios entubados de entrada 9 y salida 10 por donde puede circular un líquido atemperado para regular la temperatura de la parte cilíndrica 6. La parte superior del cuerpo está rematada con un reborde horizontal 11 que permite el apoyo del cuerpo en el soporte y de la tapa sobre el mismo para el cierre hermético una vez ensambladas las partes. La parte esférica 7 del cuerpo posee al menos dos orificios entubados 12 y 13 para la conexión de tubos flexibles y la entrada y salida de fluidos.

- **Tapa 2:** pieza metálica de forma cilíndrica maciza de unos pocos milímetros de espesor y un diámetro algo mayor que el del borde superior del cuerpo. Esta tapa tiene varios orificios 14 redondos para poder atornillarla al soporte y otros para acoplar accesorios, como tapón 15, tubos de muestreo 16, llenado 17 y trasvase del cultivo 18. En la cara exterior, la tapa tiene soldadas unas portillas cortas del mismo material para conectar tubos flexibles para adición de fluidos 19 y entrada/salida de gases 20. En la cara interna, la tapa posee un surco periférico para el acoplamiento de una junta tórica de caucho o silicona para posibilitar un sellado hermético con el cuerpo.
- **Soporte 3:** pieza metálica de cuatro tubos de unos pocos milímetros de sección 21, en disposición paralela, soldados en un extremo (el de apoyo en suelo) a un tubo que forma una circunferencia incompleta 22 y por el otro, a un aro macizo 23 del mismo diámetro externo que la tapa y diámetro interno ligeramente superior al del cuerpo. Este aro 23 tiene varios orificios que coinciden con los de la tapa 14 para que puedan ser acoplados mediante tornillos que atraviesan ambas piezas. El aro también tiene asas soldadas 24 para facilitar el transporte de la pieza y tres piezas atornilladas 25 rematadas en material flexible, como teflón, donde apoya el cuerpo para evitar la fractura del vidrio a causa de tensiones.

A continuación se detalla el funcionamiento del biorreactor:

Se llevan a cabo operaciones preparatorias de esterilización por separado del biorreactor ensamblado con todos los tubos y tornillos accesorios y todos los orificios cerrados excepto el 20 donde se acopla un filtro de aire. También se dispone de dos reservorios 26 de cierre

hermético y capacidad suficiente para contener todo el volumen operativo del biorreactor, conteniendo ambos medio de cultivo. El cierre del reservorio posee dos orificios entubados, uno para entrada/salida de aire 28, al cual se acopla el filtro de aire, y otro para entrada/salida de líquido 27, al cual se acopla internamente un tubo flexible de longitud suficiente para llegar al fondo del biorreactor. Los tres recipientes, biorreactor ensamblado y los dos reservorios están desconectados de las líneas de aire y agua.

A continuación, se produce el llenado o vaciado del biorreactor ensamblado esterilizado. Para ello, se conecta el biorreactor mediante tubo de silicona estéril bifurcado con una T entre los orificios 17 y 27 con los dos reservorios 26 llenos de medio estéril. El líquido de un reservorio 26 se trasvasa al biorreactor pinzando el tubo que va al otro reservorio y conectando la línea de aire a entrada/salida de aire 28 en el reservorio que tiene el paso franco. Para trasvasar el líquido del otro reservorio se operaría de la misma forma. Estas operaciones se pueden revertir en cualquier momento para el vaciado del biorreactor cambiando la línea de aire de 28 a 20, cerrando el orificio 17 y mediante tubo de silicona estéril bifurcado con una T conectando el biorreactor con un reservorio 26 vacío entre los orificios 12 y 27. El ciclo de vaciado y llenado se puede repetir tantas veces como se desee. Este modo de realización es el que posibilita el cambio de medio en el biorreactor en condiciones asépticas.

En el siguiente paso se produce el aireado y agitado neumático del biorreactor lleno. Así, la línea de aire estéril libre de aceite se conecta al orificio entubado 13 permitiendo la entrada de aire a la parte esférica 7, el paso de aire a través de la base porosa 5, lo cual tiene efecto difusor, y el paso de aire difundido en forma de pequeñas burbujas a la parte cilíndrica 6 por donde ascienden libremente a través del líquido produciendo el efecto de aireado y agitado neumático. El aire que atraviesa el líquido sale de la parte cilíndrica 6 a través de la entrada/salida de gases 20, evitando que se produzca sobrepresión en el recipiente. El resto de orificios del biorreactor están cerrados. Considerando las dimensiones del biorreactor, la línea de aire estéril debe suministrar un flujo de al menos 5 litros por minuto para una aireación y agitación efectivas.

A continuación, el biorreactor es inoculado. Para ello, la entrada de aire en 13 se desconecta y se cierra temporalmente y se coloca el biorreactor en un entorno aséptico, como el de una campana de flujo laminar. En ese entorno, se retira el tapón del orificio 15 de mayor diámetro que el resto y a través de él se vierte al biorreactor una cierta cantidad de

suspensión de células que se desea cultivar. Las células vegetales proceden de una suspensión celular obtenida por dispersión en medio líquido con agitación orbital moderada (100-150 rpm) de un callo de células desdiferenciadas a partir de tejido vegetal cultivado in vitro (Vera-Urbina y col., 2013). La operación se facilita con la ayuda de un embudo
5 previamente esterilizado. Finalmente se vuelve a cerrar el orificio 15 con su tapón.

Después, se cultivan células vegetales en modo "lote" a partir de un inóculo de suspensión celular. Tras la inoculación se retira el biorreactor del entorno aséptico y se vuelve a conectar la línea de aire estéril a 13. El cultivo en el biorreactor se mantiene con un
10 suministro continuo de aire para favorecer la homogeneidad y crecimiento del cultivo durante el tiempo necesario, hasta que éste alcance la fase estacionaria de crecimiento o una cantidad deseada de biomasa. El cultivo se recupera finalmente desensamblando la tapa y trasvasándolo a otro recipiente.

15 La línea de aire 13 puede saturarse de agua haciéndola atravesar un recipiente de agua estéril, lo que evitaría pérdidas de volumen del biorreactor durante periodos largos de cultivo.

Además, se cultivan células vegetales en modo "lote alimentado" a partir de un cultivo previo
20 in situ. Tras un cultivo en lote, el medio agotado de nutrientes es desplazado desde el biorreactor a un reservorio 26 vacío mediante la operación de vaciado descrita previamente. La biomasa queda retenida en el biorreactor sobre la base porosa ya que el tamaño de los agregados celulares es mayor que los poros. Una vez vaciado el medio, el biorreactor se llena con medio nuevo rico en nutrientes contenido en otro reservorio 26 mediante la
25 operación de llenado descrita previamente. Una vez llenado se continúa según la descripción de cultivo en "lote" de nuevo. Este ciclo de vaciado de medio agotado, suministro de medio rico y cultivo técnicamente se puede repetir tantas veces como se desee. Tras el último ciclo, el cultivo se recupera como se describe para modo "lote".

30 A continuación se detallan algunos ejemplos de cultivo:

EJEMPLO 1: Cultivo de una suspensión celular de *Vitis vinífera* en modo lote.

El cultivo se hizo por duplicado. Una cantidad de células frescas escurridas que se habían
35 cultivado en matraces agitados hasta fase estacionaria equivalente a un 2,2% peso/volumen

se inoculó en el biorreactor conteniendo 6675mL de medio de cultivo cuya composición está descrita en la literatura (Bru, R., Selles, S., Casado-Vela, J., Belchi-Navarro, S., Pedreño, M. A. (2006). Modified cyclodextrins are chemically defined glucan inducers of defense responses in grapevine cell cultures. J Agr Food Chem. 54 (1): 65-67). La temperatura del cultivo se mantuvo constante a 24°C mediante flujo de agua termostatzada a través de la doble pared del cuerpo. Inicialmente se insufló aire a un flujo de 0,3 litros por litro de cultivo y minuto ($\text{L}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$) y se fue ajustando para evitar la sedimentación celular a lo largo del cultivo hasta un valor máximo de $0,6 \text{ L}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$. Periódicamente, el medio se trasvasaba a un recipiente vacío (ver modos de realización) para medir mediante una escala adosada al cuerpo el volumen de empaquetamiento celular (VEC) como medida de la biomasa. Asimismo, se tomó periódicamente una muestra del cultivo para medir variables relacionados con la actividad metabólica del cultivo (sacarosa, glucosa, pH, conductividad) por métodos descritos en la literatura (Vera-Urbina y col., 2013). El resultado de las dos replicas y los parámetros resultantes se muestran en la Tabla 1. De media, el cultivo tardó 28,5 días en alcanzar la fase estacionaria incrementándose la biomasa en 7,1 veces.

Tabla 1. Valores de producción y parámetros cinéticos del crecimiento de biomasa de células de vid en el biorreactor. TC: tiempo de cultivo, VO: volumen de operación, PF: peso fresco, FM: Factor de multiplicación, td: Tiempo de duplicación.

Réplica	Biomasa inicial		TC	VO	Biomasa final		Incremento Biomasa	FM	t _d
Núm.	(%, m/v)	PF (g)	(días)	(mL)	(%, m/v)	PF (g)	PF (g)		(días)
1	2,22	148,5	28	6675	15,1	1008,3	859,79	6,8	5,6
2	2,23	149,0	29	6675	16,2	1080,9	931,86	7,3	6,4
Promedio	2,3±0,01	148,8±0,3	28,5±0,7		15,7±0,8	1044,6±51.3		7,1±0,4	6,0±0,6

Réplica	Producción	Productividad	Producción específica	Tasa de crecimiento celular
Núm.	[g.L ⁻¹]	[g.L ⁻¹ .días ⁻¹]	[g biom. g subs ⁻¹]	μ (días ⁻¹)
1	132,1	4,7	6,6	0,1248
2	143,4	4,9	7,2	0,1078
Promedio	137,8±8,0	4,8±0,1	6,9±4,0	0,116±0,012

EJEMPLO 2: Producción extracelular del compuesto trans-resveratrol en modo lote y modo lote alimentado por una suspensión celular de Vitis vinífera.

Una cantidad de 1395g de células frescas escurridas que se habían cultivado en matraces agitados hasta fase estacionaria se inoculó en el biorreactor conteniendo 4500mL de medio

de elicitación cuya composición está descrita en la literatura (Lijavetzky, D., Almagro, L., Belchi-Navarro, S., Matínez-Zapater, J. M., Bru, R., Pedreño, M. A. (2008). Synergistic effect of methyljasmonate and cyclodextrin on stilbene biosynthesis pathway gene expression and resveratrol production in Monastrell grapevine cell cultures. BMC Research Notes. 1:132), dando un volumen final de 5500mL de cultivo (inóculo equivalente a un 25,3% peso/volumen). La temperatura del cultivo se mantuvo constante a 24°C y la aireación también a un flujo de 0,43 l.l⁻¹.min⁻¹. Periódicamente se tomó una muestra del cultivo para medir la concentración de trans-resveratrol extracelular, además de variables relacionadas con la actividad metabólica del cultivo (sacarosa, glucosa, pH, conductividad) por métodos descritos en la literatura (Vera-Urbina y col., 2013). Cuando la concentración de trans-resveratrol superó los 3g/L se procedió a la sustitución del medio agotado en nutrientes y rico en producto por medio fresco de elicitación, mediante el modo de realización “lote alimentado”. De esta forma se realizaron 3 ciclos de producción cuyos resultados se resumen en la Tabla 2. La duración media de los ciclos fue de 4,2 días con una producción media de 15,2 g/ciclo.

Tabla 2. Valores de producción de trans-resveratrol obtenidos en medio de elicitación (Lijavetzky et al. 2008) por lote-alimentado mediante inoculación directa (25% -m/v-) con suspensiones celulares de vid (*Vitis vinifera* L. c.v.Gamay) en el biorreactor.

Ciclo de producción	Tiempo de Elicitación (días)	Producción		Productividad	Producción específica	
		(mg.mL ⁻¹)	(mg)		(mg.g biomasa ⁻¹)	(mg.g sustrato ⁻¹)
Ciclo 1	5,6	2,92±0,03	13 153,6±139,9	0,53±0,01	9,4±0,1	146,2±1,6
Ciclo 2	3,4	3,52±0,13	15 504,2±559,1	1,04±0,04	11,1±0,4	172,3±6,2
Ciclo 3	3,6	3,99±0,02	16 937,7±90,8	1,12±0,01	12,1±0,1	188,2±1,0
Promedio	4,2±1,2	3,48±0,53	15 198,5±1900	0,90±0,32	10,9±1,4	168,9±21,2

EJEMPLO 3: Producción extracelular del compuesto trans-resveratrol en modo lote alimentado acoplado a un cultivo en modo lote de una suspensión celular de *Vitis vinifera*.

Haciendo uso del diseño ventajoso del biorreactor, los dos procesos necesarios para la producción del compuesto extracelular por el cultivo de células vegetales, se integran en un

solo proceso operando solo en modo lote alimentado. Para acortar el periodo de crecimiento de biomasa se utilizó un inóculo más fuerte, una cantidad de 580g de células frescas escurridas que se ha cultivado en matraces agitados hasta fase estacionaria que se inoculó en el biorreactor conteniendo 5300mL de medio de cultivo dando un volumen de cultivo de 5827mL (inóculo equivalente a un 10% peso/volumen). La temperatura del cultivo se mantuvo constante a 24°C y el flujo aire se fue ajustando de 0,47 inicial hasta 0,54 l.l⁻¹.min⁻¹ final. El crecimiento y las variables relacionados con la actividad metabólica del cultivo se midieron como en el Ejemplo 1. Tras 8 días de crecimiento se alcanzó un 26,6% VEC (equivalente a 18,4% peso/volumen). En ese momento se procede a la sustitución del medio de crecimiento por medio fresco de elicitación, mediante el modo de realización lote alimentado. Procediendo a partir de aquí de la misma forma que en el Ejemplo 2, de modo que se realizaron 4 ciclos de producción cuyos resultados se resumen en la Tabla 3. El cuarto ciclo fue muy poco productivo, por lo que los rendimientos se calcularon sobre los ciclos 1 a 3. La duración media de los ciclos fue de 5,6 días con una producción media de 11,9 g/ciclo.

Tabla 3. Valores de la producción de trans-resveratrol obtenidos con suspensiones celulares de vid en medio de elicitación (Lijavetzky et al. 2008) en el biorreactor implementando un sistema de producción por lote-alimentado proveniente del acoplamiento de producción de biomasa seguida de elicitación.

Ciclo de producción	Tiempo de elicitación (días)	Producción		Productividad	Producción específica	
		(mg.mL ⁻¹)	(mg)		(mg. g biomasa ⁻¹)	(mg. g sustrato ⁻¹)
Ciclo 1	6	3,57±0,04	14 867,8±169,3	0,60±0,01	14,0±0,2	165,2±1,9
Ciclo 2	5	2,48±0,13	10 679,1±539,7	0,50±0,03	10,0±0,5	118,7±6,0
Ciclo 3	6	2,35±0,03	10 018,6±144,4	0,39±0,01	9,4±0,1	111,3±1,6
Ciclo 4	4	0,23±0,01	1 018,4±18,5	0,06±0,00	0,96±0,02	11,32±0,2
Promedio (ciclos 1-3)	5,6±0,6	2.80±0.67	11 856,7±2,630	0,49±0.10	11,1±2,5	131,7±29.2

REIVINDICACIONES

1. Biorreactor tipo columna de burbujeo para cultivo de células vegetales en suspensión que comprende tres partes principales ensambladas y esterilizadas:

- Cuerpo: recipiente de sección transversal circular con paredes rectas que comprende al menos dos partes, una parte cilíndrica y una esférica.
- Tapa: pieza de forma cilíndrica que cierra la parte superior abierta del cuerpo.
- Soporte: pieza que permite la sujeción del cuerpo y la tapa.

Caracterizado porque el cuerpo comprende una base porosa que separa las dos partes del mismo, la parte cilíndrica y la esférica; y comprende también al menos dos orificios entubados, uno de ellos conectado a una línea de aire estéril libre de aceite con flujo regulable y otro para la circulación de líquidos o gases. Además, la tapa comprende al menos orificios para llenado, trasvase del cultivo y entrada/salida de gases.

2. Biorreactor tipo columna de burbujeo para cultivo de células vegetales en suspensión según la reivindicación 1, donde el cuerpo comprende una pluralidad de orificios entubados para la conexión de tubos flexibles y la entrada y salida de fluidos.
3. Biorreactor tipo columna de burbujeo para cultivo de células vegetales en suspensión según la reivindicación 1, donde el cuerpo, en su parte cilíndrica, comprende una doble pared que está rematada con un reborde horizontal.
4. Biorreactor tipo columna de burbujeo para cultivo de células vegetales en suspensión según la reivindicación 1, donde el cuerpo, en la doble pared de la parte cilíndrica, comprende al menos un orificio entubado de entrada y otro de salida para que circule un líquido atemperado.
5. Biorreactor tipo columna de burbujeo para cultivo de células vegetales en suspensión según la reivindicación 1, donde el cuerpo es transparente u opaco.
6. Biorreactor tipo columna de burbujeo para cultivo de células vegetales en suspensión según la reivindicación 1, donde el cuerpo es de vidrio o de acero.
7. Biorreactor tipo columna de burbujeo para cultivo de células vegetales en suspensión según la reivindicación 1, donde la tapa tiene una pluralidad de orificios para poder fijarla al soporte y acoplar accesorios, como tapón, tubos de muestreo y llenado.

8. Biorreactor tipo columna de burbujeo para cultivo de células vegetales en suspensión según la reivindicación 1, donde la tapa es de acero inoxidable.
9. Biorreactor tipo columna de burbujeo para cultivo de células vegetales en suspensión según la reivindicación 1, donde el soporte es una pieza que comprende al menos cuatro tubos, en disposición paralela equidistante, soldados en el extremo de apoyo al suelo, a un tubo en forma de circunferencia incompleta y por el otro, a un aro macizo con orificios que permiten el acople con la tapa.
10. Biorreactor tipo columna de burbujeo para cultivo de células vegetales en suspensión según la reivindicación 1, donde el soporte es de acero inoxidable.
11. Biorreactor tipo columna de burbujeo para cultivo de células vegetales en suspensión según la reivindicación 1, donde el biorreactor se conecta a reservorios para el intercambio de líquido mediante tubos flexibles de silicona autoclavables con las entradas y salidas del biorreactor.
12. Biorreactor tipo columna de burbujeo para cultivo de células vegetales en suspensión según la reivindicación 1, donde el biorreactor se conecta con un dispositivo de toma aséptica de muestras a través del tubo de toma de muestras de la tapa.

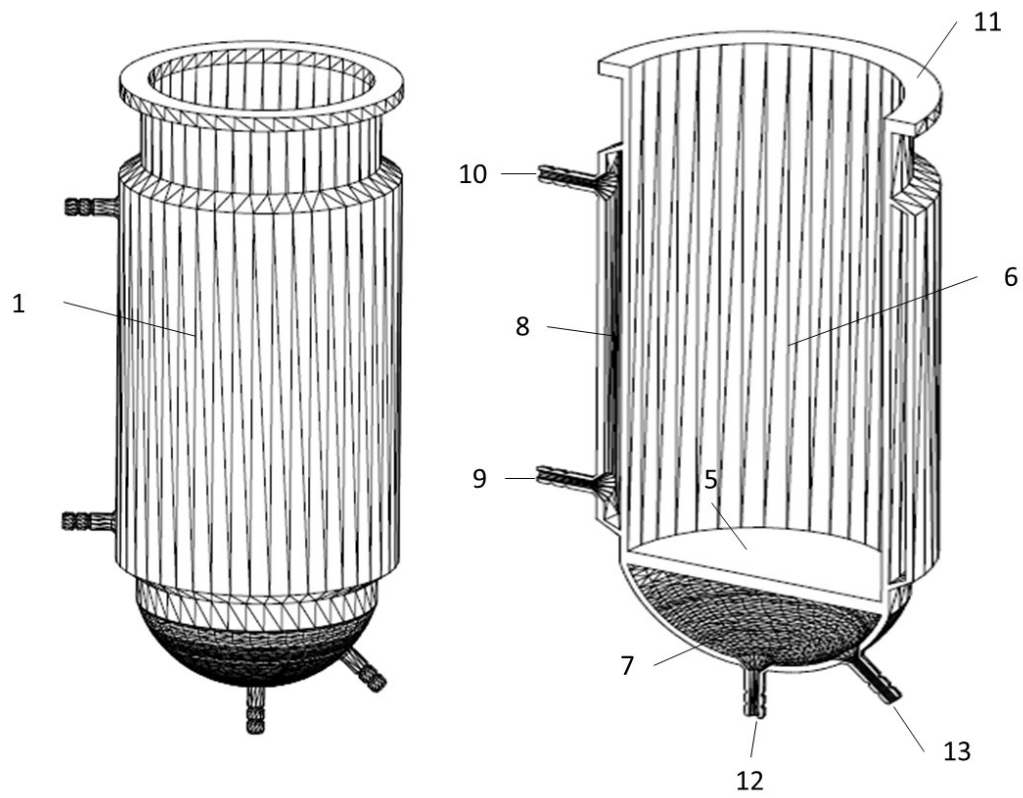


FIGURA 1

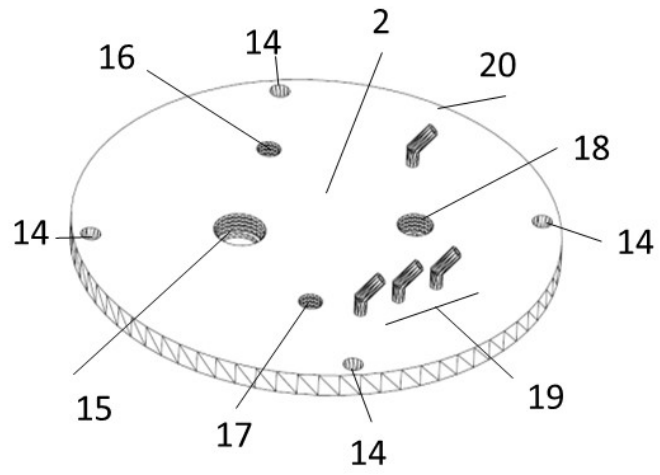


FIGURA 2

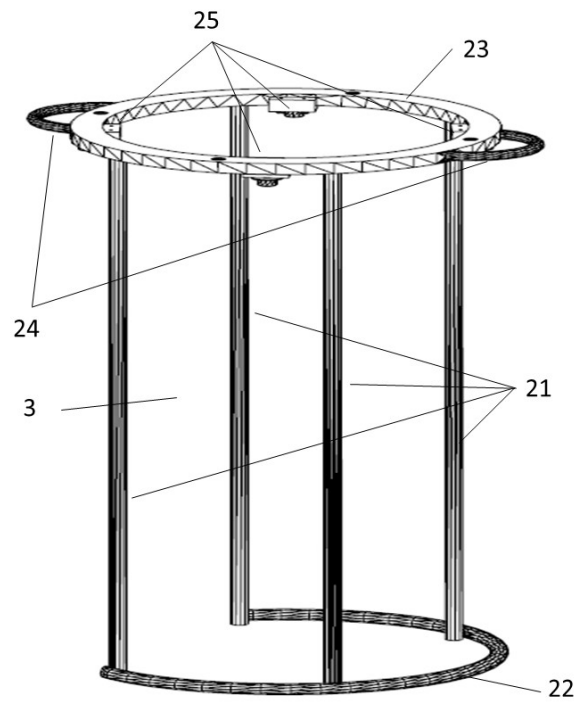


FIGURA 3

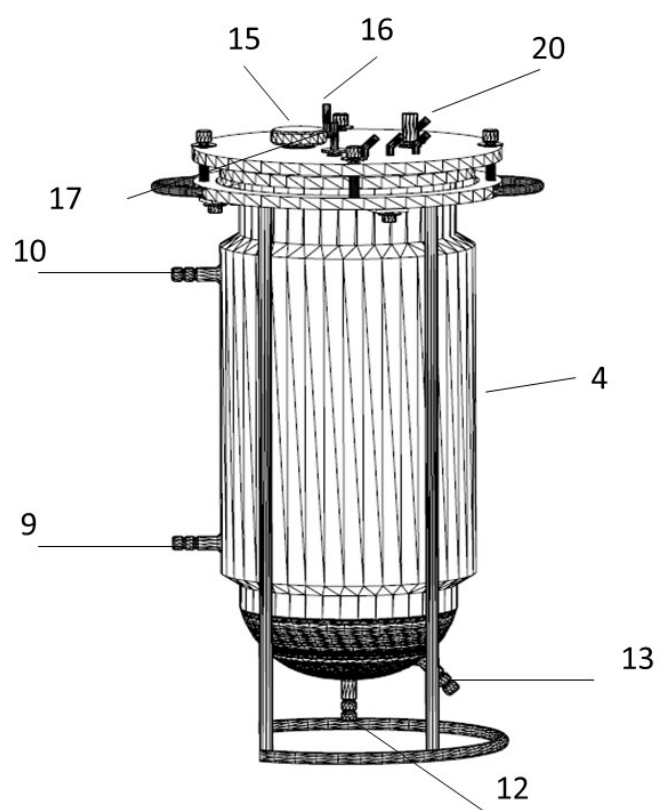


FIGURA 4

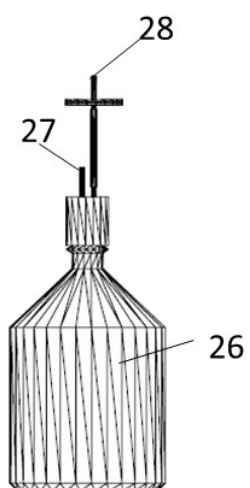


FIGURA 5



- ②① N.º solicitud: 201730479
②② Fecha de presentación de la solicitud: 30.03.2017
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 2008135991 A2 (PROTALIX LTD et al.) 13/11/2008, Resumen y figuras.	1-12
A	(RAMACHANDRA RAO S; RAVISHANKAR G A) 01/05/2002, Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. Biotechnology Advances 20: 101-153. doi:10.1016/S0734-9750(02)00007-1	1-12
A	JP H08163981 A (SHISEIDO CO LTD) 25/06/1996, Resumen y figuras	1-12

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
28.04.2017

Examinador
I. Abad Gurumeta

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N5/04 (2006.01)**C12M1/00** (2006.01)**C12M3/00** (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, C12M

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, INTERNET, MEDLINE, EMBASE, BIOSIS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 28.04.2017

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-12	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-12	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WO 2008135991 A2 (PROTALIX LTD et al.)	13.11.2008
D02	(RAMACHANDRA RAO S; RAVISHANKAR G A)	01.05.2002
D03	JP H08163981 A (SHISEIDO CO LTD)	25.06.1996

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**NOVEDAD (ART. 6.1 Ley 11/1986) Y ACTIVIDAD INVENTIVA (ART. 8.1 Ley 11/1986)**

El documento D01 se refiere a un biorreactor reutilizable y desechable para cultivar tejidos o células vegetales de recipiente no rígido que tiene dimensiones y puertos de intercambio de gas diseñados para mantener la saturación de oxígenos y fuerzas de cizallamiento adecuadas para el cultivo (ver resumen y figuras), indicar además del biorreactor es cilíndrico con base cónica. Por otro lado, el objeto de la presente invención se refiere a un biorreactor tipo columna de burbujeo para el cultivo de células vegetales en suspensión que consta de cuerpo de base porosa, tapa y soporte, además de conexiones, por un lado, de aire estéril y, por otro lado, líquidos y gases (reivindicaciones 1-12), siendo el cuerpo cilíndrico de base esférica con base porosa en la separación de ambas partes. Por todo ello, al ser ambos biorreactores sustancialmente diferentes, aunque destinados al cultivo de células vegetales ambos, como en el biorreactor de la presente solicitud se mejoran las condiciones de cultivo se considera que el objeto de la invención cumple los requisitos de novedad y de actividad inventiva de acuerdo con los Artículos 6.1 y el 8.1 de la Ley de Patentes 11/1986.

El documento D02 publica un estudio de producción metabólica de cultivos de células vegetales usando biorreactor de tanque agitado por dispositivos mecánicos que no son óptimas para la producción a escala industrial (ver resumen y 13. Conclusiones). La presente solicitud se refiere a un biorreactor tipo columna de burbujeo para el cultivo de células vegetales en suspensión que consta de cuerpo de base porosa, tapa y soporte, además de conexiones, por un lado, de aire estéril y, por otro lado, líquidos y gases (reivindicaciones 1-12). En consecuencia, al no usar dispositivos mecánicos como en la publicación el objeto de la invención cumple los requisitos de novedad y de actividad inventiva de acuerdo con los Artículos 6.1 y el 8.1 de la Ley de Patentes 11/1986.

El documento D03 muestra un biorreactor para cultivo de células vegetales entre otros, con flujo de convección de un fluido de cultivo desde arriba hacia abajo a lo largo de una pared de flujo rectificadora, así como el flujo de fluido de cultivo en la dirección de cruce de pared, con placa porosa vertical de separación, funcionando la parte interior como un biorreactor tipo columna de burbujeo (ver resumen y figuras). Sin embargo, la estructura del biorreactor difiere del descrito en la presente solicitud (reivindicaciones 1-12), por lo que se cumplen los requisitos de novedad y de actividad inventiva de acuerdo con los Artículos 6.1 y el 8.1 de la Ley de Patentes 11/1986.

Por lo tanto, a la vista del estado de la técnica, el objeto de las reivindicaciones 1-12 cumplen los requisitos de novedad y de actividad inventiva de acuerdo con los Artículos 6.1 y el 8.1 de la Ley de Patentes 11/1986.

REQUISITOS DE PATENTABILIDAD (ART. 4.1 LEY 11/1986)

En conclusión, se considera que las reivindicaciones 1-12 satisfacen los requisitos de patentabilidad establecidos en el Artículo 4.1 de la Ley de Patentes 11/1986.