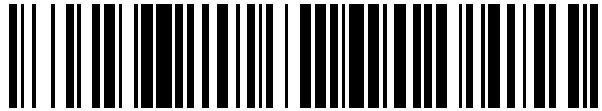


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 636 481**

51 Int. Cl.:

A61L 27/48 (2006.01)

C12P 19/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.03.2011 PCT/DE2011/000269**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.09.2011 WO11113423**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.03.2011 E 11718257 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.05.2017 EP 2547372**

54 Título: **Biomateriales multifásicos a base de nanocelulosa sintetizada por bacterias y procedimiento para su producción**

30 Prioridad:

19.03.2010 DE 102010012437

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

05.10.2017

73 Titular/es:

**JENACELL GMBH (100.0%)
Winzerlaer Str. 2
07745 Jena, DE**

72 Inventor/es:

**HESSLER, NADINE;
SULTANOVA, BARNO y
KLEMM, DIETER**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 636 481 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

Biomateriales multifásicos a base de nanocelulosa sintetizada por bacterias y procedimiento para su producción

- La invención se refiere biomateriales multifásicos a base de nanocelulosa sintetizada por bacterias y a un procedimiento para su producción. Los materiales de BNC propuestos se caracterizan, para una amplia aplicación por ejemplo en medicina (apósitos de heridas, los más diversos implantes), en la técnica (membranas, láminas, capas de barrera) y en la rama alimentaria (alimentación sin calorías, envasado), por estructuras y propiedades de material que en esencia se pueden determinar de manera universal. Esta consecución, con especificidad de aplicación, de estructuras y propiedades definidas e incluso en sí nuevas para materiales de BNC se refiere en particular a las resistencias mecánicas, elasticidad, transparencia y equilibrio hídrico, en especial la capacidad de un rehinchamiento de adecuado a completo después del secado, al igual que las denominadas funciones de filtro/membrana (permeabilidad) y propiedades de armazón (*scaffold*) (sistema de poros, característica superficial, colonización por células) así como la biocompatibilidad (compatibilidad con el cuerpo, endotelización, invasión por células propias del cuerpo, integración permanente en el cuerpo), sin que se requieran aditivos desventajosos o formaciones compuestas que se producen durante la síntesis con los mismos.
- En general se sabe cómo modificar, para influir en biomateriales homogéneos o multifásicos a base de nanocelulosa sintetizada por bacterias (BNC), este material después de su síntesis (*post* modificación) (K.-Y. Lee, J. J. Blaker, A. Bismarck: Surface functionalisation of bacterial cellulose as the route to produce green polylactide nanocomposites with improved properties, *Composites Science and Technology* (2009), 69(15-16), 2724-2733; D. Klemm, D. Schumann, F. Kramer, N. Heßler, M. Hornung, H.-P. Schmauder, S. Marsch: Nanocelluloses as Innovative Polymers in Research and Application. *Advances in Polymer Science* (2006), 205(Polysaccharides II), 49-96). Por el contrario también es posible efectuar ya con la síntesis del proceso de cultivo biotecnológico una modificación *in situ* (H. Wang, F. Guan, X. Ma, S. Ren: Production and performance determination of modified bacterial cellulose, *Shipin Keji* (2009), (5), 28-31; N. Hessler, D. Klemm: Alteration of bacterial nanocellulose structure by *in situ* modification using polyethylene glycol and carbohydrate additives, *Cellulose (Dordrecht, Netherlands)* (2009), 16(5), 899-910; D. Klemm, D. Schumann, F. Kramer, N. Heßler, M. Hornung, H.-P. Schmauder, S. Marsch: Nanocelluloses as Innovative Polymers in Research and Application. *Advances in Polymer Science* (2006), 205(Polysaccharides II), 49-96). En este caso, durante la biosíntesis se añaden diferentes aditivos al medio nutriente (por ejemplo, M. Seifert: Modifizierung der Struktur von Bakteriencellulose durch die Zusammenstellung des Nährmediums bei der Kultivierung von *Acetobacter xylinum*, Promotionsarbeit, Friedrich-Schiller-Universität Jena, 2004; O. M. Astley, E. Chanliaud, A. M. Donald, M. J. Gidley: Structure of *Acetobacter* cellulose composites in the hydrated state, *International journal of biological macromolecules* (2001), 29/3, 193-202; N. Sakairi, H. Asano, M. Ogawa, N. Nishi, S. Tokura: A method for direct harvest of bacterial cellulose filaments during continuous cultivation of *acetobacter xylinum*. *Carbohydrate Polymers* (1998), 35/3-4, 233-7; C. H. Haigler, A. R. White, R. M. Brown Jr., K. M. Cooper: Alteration of *In Vivo* Cellulose Ribbon Assembly by Carboxymethylcellulose and Other Cellulose Derivative, *J Cell Biology* (1982), 94, 64-9). Por consiguiente, la adición de carboximetilcelulosa (CMC) así como metilcelulosa (MC) tiene enormes efectos sobre la red de BNC. Ambos aditivos, como consecuencia de su inclusión, influyen en el sistema de poros y las propiedades resultantes a partir de ello, tales como por ejemplo elasticidad, capacidad de absorción de agua o de retención de agua, función de filtro, por lo que se producen materiales de BNC novedosos (O. M. Astley, E. Chanliaud, A. M. Donald, M. J. Gidley: Structure of *Acetobacter* cellulose composites in the hydrated state, *International journal of biological macromolecules* (2001), 29/3, 193-202; N. Sakairi, H. Asano, M. Ogawa, N. Nishi, S. Tokura: A method for direct harvest of bacterial cellulose filaments during continuous cultivation of *acetobacter xylinum*. *Carbohydrate Polymers* (1998), 35/3-4, 233-7; C. H. Haigler, A. R. White, R. M. Brown Jr., K. M. Cooper: Alteration of *In Vivo* Cellulose Ribbon Assembly by Carboxymethylcellulose and Other Cellulose Derivative, *J Cell Biology* (1982), 94, 64-9).
- Además, la adición de componentes secundarios de pared celular vegetales, tales como xiloglucano o pectina, al medio nutriente durante la biosíntesis de BNC fue parte de investigaciones para imitar relaciones estructurales de celulosa nativa y analizar su formación al detalle (J. Cybulska, E. Vanstreels, Q. T. Ho, C. M. Courtin, V. Van Craeyveld, B. Nicolai, A. Zdunek, K. Konstankiewicz: Mechanical characteristics of artificial cell walls, *Journal of Food Engineering* (2009), 96(2), 287-294).
- A diferencia de los compuestos solubles en agua se puede añadir también durante la biosíntesis sólidos como aditivos al medio nutriente que se incorporan en la red de BNC formada. Mientras que Udhardt (U. Udhardt: *Synthese, Eigenschaften und Strukturdesign von Bakteriencellulose mit speziellem Anwendungspotential von BASYC®-Implantaten in der Mikrochirurgie*, Promotionsarbeit, Friedrich-Schiller-Universität Jena, 2004) describió una incorporación de bolas de vidrio o una inclusión de gel de sílice así como sales inorgánicas (carbonato de calcio) en la red de BNC, Serafica *et al.* (G. Serafica, R. Mormino, H. Bungay: Inclusion of solid particles in bacterial cellulose, *Applied Microbiology and Biotechnology* (2002), 58/6, 756-60) describieron sobre todo la integración de metales (aluminio) o de partículas de óxidos de metal (óxido de hierro).

Sin embargo, la desventaja de estos procedimientos *in situ* radica en la necesidad de aditivos para producir biomateriales novedosos a base de BNC. Así, solo con ayuda de sustancias orgánicas, inorgánicas solubles en agua

o polímeros así como partículas de sólidos es posible un control de la estructura y las propiedades asociadas a ello. Además, los aditivos incorporados en el uso como producto médico albergan el riesgo de posibles reacciones alérgicas frente a BNC puro. En el caso de la *post* modificación se consigue una modificación de los BNC así como la generación de materiales homogéneos o multifásicos mediante la incorporación de sustancias orgánicas o inorgánicas después del cultivo (B. R. Evans, H. O'Neil, M. Hugh, V. P. Malyvanh, I. Lee, J. Woodward: Palladium-bacterial cellulose membranes for fuel cells, *Biosensors & Bioelectronics* (2003), 18/7, 917-23; B. R. Evans, H. M. O'Neill, E. Greenbaum: Electron Transfer by Enzymes and Photosynthetic Proteins Immobilized in Polysaccharide Composites, Abstracts, 57th Southeast/61st Southwest Joint Regional Meeting of the American Chemical Society, Memphis, TN, Estados Unidos, Noviembre 1-4, 2005; W. A. Daoud, J. H. Xin, Y.-H.Zhang: Surface functionalization of cellulose fibers with titanium dioxide nanoparticles and their combined bactericidal activities, *Surface Science* (2005), 599(1-3), 69-75; D. Zhang, L. Qi: Synthesis of mesoporous titania networks consisting of anatase nanowires by templating of bacterial cellulose membranes, *Chem. Commun.* (2005), 21, 2735-7). Con ayuda de este método ya se ha realizado una pluralidad de variaciones de BNC, por ejemplo mediante el empleo de distintos tipos de monómeros y polímeros sintéticos (H. Yano, S. Nakahara: Biocomposites produced from plant microfibril bundles with a nanometer unit web-like network, *Journal of Materials Science* (2004), 39/5, 1635-8; V. Dubey, L. K. Pandey, C. Saxena: Pervaporative separation of ethanol/water azeotrope using a novel chitosan-impregnated bacterial cellulose membrane and chitosan-poly(vinyl alcohol) blends, *Journal of Membrane Science* (2005), 251(1-2), 131-136; V. Dubey, C. Saxena, L. Singh, K. V. Ramana, R. S. Chauhan: Pervaporation of binary waterethanol mixtures through bacterial cellulose membrane, *Separation and Purification Technology* (2002), 27/2, 163-71; W. A. Daoud, J. H. Xin, Y.-H. Zhang: Surface functionalization of cellulose fibers with titanium dioxide nanoparticles and their combined bactericidal activities, *Surface Science* (2005), 599(1-3), 69-75), polímeros formadores de estructura tales como PVA (T. Wan, Y. Zhu: Preparation of bacterial cellulose/poly(vinyl alcohol) composite gels, *Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu* CN 101570616, 2009), gelatinas (K. Yasuda, J. P. Gong, Y. Katsuyama, A. Nakayama, Y. Tanabe, E. Kondo, M. Ueno, Y. Osada: Biomechanical properties of high-toughness double network hydrogels, *Biomaterials* (2005), 26/2, 4468-75; A. Nakayama, A. Kakugo, J. P. Gong, Y. Osada, M. Takai, T. Erata, S. Kawano: High mechanical strength double-network hydrogel with bacterial cellulose, *Advanced Functional Materials* (2004), 14/11, 1124-8) así como sustancias inorgánicas tales como sales de calcio, metales, óxidos de metal (B. R. Evans, H. O'Neil, M. Hugh, V. P. Malyvanh, I. Lee, J. Woodward: Palladium-bacterial cellulose membranes for fuel cells, *Biosensors & Bioelectronics* (2003), 18/7, 917-23; B. R. Evans, H. M. O'Neill, E. Greenbaum: Electron Transfer by Enzymes and Photosynthetic Proteins Immobilized in Polysaccharide Composites, Abstracts, 57th Southeast/61st Southwest Joint Regional Meeting of the American Chemical Society, Memphis, TN, Estados Unidos, Noviembre 1-4, 2005; Daoud, J. H. Xin, Y.-H.Zhang: Surface functionalization of cellulose fibers with titanium dioxide nanoparticles and their combined bactericidal activities, *Surface Science* (2005), 599(1-3), 69-75; D. Zhang, L. Qi: Synthesis of mesoporous titania networks consisting of anatase nanowires by templating of bacterial cellulose membranes, *Chem. Commun.* (2005), 21, 2735-7).

Sin embargo, la desventaja aquí radica por un lado en que son necesarios dos pasos de producción (síntesis de los BNC así como su modificación) para desarrollar BNC novedosos. Además, la *post* modificación cambia los BNC en parte en tal medida que se pierde la estructura única y, por tanto, las excelentes propiedades. Por otro lado también en estos casos existe el uso desventajoso de aditivos.

Otra solución para la preparación de nuevos materiales de BNC incluye el cultivo conjunto de bacterias de cepas diferentes. Así, A. Seto *et al.* (A. Seto, Y. Saito, M. Matsushige, H. Kobayashi, Y. Sasaki, N. Tonouchi, T. Tsuchida, F. Yoshinaga, K. Ueda, T. Beppu: Effective cellulose production by a coculture of *Gluconacetobacter xylinus* and *Lactobacillus mali*, *Applied Microbiology and Biotechnology* (2006), 73(4), 915-921), C. Choi *et al.* (documento KR 2002/067226) así como H. Seto *et al.* (documento JP 10201495), mostraron que mediante el cocultivo de una cepa bacteriana formadora de celulosa (*Acetobacter xylinum* (st-60-12)) con una cepa de *Lactobacillus* (*Lactobacillus mali* (st-20)) se pudo optimizar el rendimiento de la celulosa sintetizada. Esto se basa sobre todo en los productos metabólicos, tales como por ejemplo ácido acético, de la cepa de *Lactobacillus* que respaldan la biosíntesis de la celulosa (A. Seto, Y. Saito, M. Matsushige, H. Kobayashi, Y. Sasaki, N. Tonouchi, T. Tsuchida, F. Yoshinaga, K. Ueda, T. Beppu: Effective cellulose production by a coculture of *Gluconacetobacter xylinus* and *Lactobacillus mali*, *Applied Microbiology and Biotechnology* (2006), 73(4), 915-921; documento KR 2002/067226; documento JP 10201495). A diferencia de esto, el cocultivo de *Acetobacter acetii* subsp. *xylinum* (NCI 1005) con las cepas ATCC 10245 o NCI 1051 condujo al aumento de la respectiva síntesis de polímero. Así por un lado la producción de celulosa adicional y su posterior degradación causan un aumento de los nutrientes en la solución de cultivo, por lo que aumentó el rendimiento de los polímeros. Por otro lado, la presencia de celulosa en la solución de cultivo permitió la formación de polisacáridos ramificados solubles en agua (K. Tajima, H. Ito, M. Fujiwara, M. Takai, J. Hayashi: Enhancement of bacterial cellulose productivity and preparation of branched polysaccharide-bacterial cellulose composite by co-cultivation of *Acetobacter* species, *Sen'i Gakkaishi* (1995), 51(7), 323-32; K. Tajima, M. Fujiwara, M. Takai: Biological control of cellulose. *Macromolecular Symposia* (1995), 99 (Functional Polysaccharides), 149-55). El documento US2007/0053960 describe un implante biocompatible o un apósito de herida compuesto de celulosa microbiana.

Sin embargo, el campo técnico conoce en exclusiva métodos de cocultivo que se refieren al aumento de la productividad de la obtención de celulosa o a una formación de compuesto, cultivándose en cada caso una cepa

bacteriana productora de celulosa conocida para la síntesis de celulosa.

5 Un cultivo de varias cepas bacterianas diferentes con el fin de influir en la estructura y las propiedades de BNC por el contrario no se ha dado a conocer. Las modificaciones de las propiedades de BNC se causan en exclusiva por aditivos que se añaden para el cultivo o después del mismo y se incorporan en la estructura de BNC. Además está muy limitada la accesibilidad de sistemas de biomaterial multifásicos, ya que mediante una formación de compuesto resultante se pueden conseguir únicamente estructuras homogéneas.

La invención se basa en el objetivo de crear, sin aditivos y formaciones compuestas necesarios, biomateriales multifásicos a base de nanocelulosa sintetizada por bacterias, en cuyas propiedades de celulosa bacteriana se puede influir durante la síntesis de manera definida dentro de límites muy amplios.

10 De acuerdo con la invención, los biomateriales a base de nanocelulosa sintetizada por bacterias se sintetizan a partir de al menos dos cepas bacterianas formadoras de celulosa distintas hasta dar varias, es decir, al menos dos redes de celulosa bacteriana diferentes en un medio de cultivo común. De este modo, las propiedades de la celulosa bacteriana no se consiguen mediante aditivos añadidos específicamente o las formaciones compuestas que se producen en la síntesis con los mismos, sino mediante una generación controlada del sistema de fases sintetizado, compuesto de las varias redes diferentes de celulosa bacteriana.

Dichas redes de celulosa bacteriana, que se diferencian en particular en su estructura molecular y/o supramolecular, se pueden sintetizar por ejemplo como sistema de fases homogéneo combinado y pueden configurar, por tanto, una fase homogénea común del biomaterial.

20 También se puede generar una configuración enlazada de los sistemas de fases al configurarse las al menos dos redes diferentes de celulosa bacteriana como sistemas de fases en forma de capas, compuesto de al menos una fase homogénea combinada así como al menos una fase individual.

25 En función de la selección y la cantidad de las cepas bacterianas formadoras de celulosa diferentes usadas para la síntesis así como la selección de las condiciones de síntesis, en particular por la composición del medio de cultivo, únicamente por las redes sintetizadas de celulosa bacteriana y, por tanto, sin aditivos necesarios de forma obligada desventajosos como componentes de partida de la síntesis se generan nuevos biomateriales, en cuyas propiedades de celulosa bacteriana en dicho proceso de síntesis se puede influir dentro de límites muy amplios y, por tanto, se pueden controlar de forma definida durante la producción.

30 Estas propiedades de celulosa bacteriana se refieren por ejemplo al aumento o la reducción específicos del tamaño de poro así como la transparencia y la estabilidad de los materiales de BNC, tal como no se ha podido obtener mediante el cultivo en sí conocido o mediante el uso de modificación *in situ* o *post* modificación en exclusiva de una de las cepas bacterianas conocidas.

35 Incluso la consecución de propiedades en sí contradictorias para la síntesis de materiales de BNC, tales como un contenido en agua muy alto con consistencia blanda gelatinosa y estructura de material densa de alta resistencia, se puede realizar de forma sorprendente en el mismo material de nanocelulosa sintetizada por bacterias y podrían ofrecer en este caso nuevas posibilidades de empleo para materiales de BNC.

40 La estructura y las propiedades de los materiales de BNC se pueden determinar mediante relación volumétrica de las dispersiones celulares acuosas de las cepas bacterianas usadas de manera definida dentro de límites muy amplios y se pueden controlar "a medida" durante la síntesis. Este "control a medida" se puede aplicar a todas las estructuras y propiedades que sean relevantes para la aplicación de materiales de BNC en forma húmeda o seca (prensada en caliente, secada al aire o liofilizada) por ejemplo en medicina (apósitos de heridas, implantes), en la técnica (membranas, láminas, capas de barrera) y en la industria alimentaria (alimentación sin calorías, envasado). Estos se refiere al control de la resistencia mecánica, elasticidad, permeabilidad, transparencia y del equilibrio hídrico así como las denominadas propiedades de armazón (sistema de poros, característica superficial, colonización por células) y también a la biocompatibilidad (compatibilidad con el cuerpo, endotelización, invasión por células propias del cuerpo, integración permanente del cuerpo).

Durante el proceso de síntesis se puede influir en la estructura y las propiedades de los materiales de BNC en particular mediante la variación del cultivo (agrupamiento de las cepas bacterianas antes o durante la inoculación) de las respectivas cepas bacterianas productoras de celulosa, el uso de distintos medios de cultivo o mediante el uso de diferentes parámetros de cultivo (temperatura, duración, volumen, recipientes de cultivo).

50 La invención no está limitada a los denominados materiales de BNC "puros", sino que incluye también el uso de cepas bacterianas especiales que producen estructuras de tipo celulosa a base de fuentes de C modificadas, tales como por ejemplo en el caso del uso de N-acetilglucosamina o glucosamina como fuente de C.

A continuación se va a explicar con más detalle la invención mediante ejemplos de realización representados en el dibujo.

Muestran:

- 5 Figura 1: nanocelulosa sintetizada por bacterias (BNC) compuesta por varias redes diferentes de celulosa bacteriana que forman un sistema de fases homogéneo común
- Figura 2: BNC con dos redes diferentes de celulosa bacteriana que forman un sistema de fases en forma de capas compuesto por dos fases individuales en forma de capas así como una fase homogénea combinada

10 En la Figura 1 está representada una nanocelulosa sintetizada por bacterias (biomaterial de BNC), que se compone de acuerdo con la invención de varias (en el ejemplo dos) redes diferentes de celulosa bacteriana que forman un sistema de fases común de una fase homogénea combinada (1). Este sistema de fases se sintetiza a partir de dos especies de cepas de *Gluconacetobacter*, en este ejemplo ATCC 23769 y DSM 11804, en un recipiente de cultivo no representado con una superficie de síntesis de 7 cm² que, sin embargo, para la formación de fases especial en este ejemplo de realización se puede seleccionar libremente. Las dos cepas bacterianas se ponen después de la preparación por separado juntas en el recipiente de cultivo y así se inoculan para la síntesis común. Un medio de cultivo añadido se compone de una fuente de carbono (preferentemente distintos de azúcares y sus derivados), de una fuente de nitrógeno (preferentemente peptona), de una fuente de vitaminas (preferentemente extracto de levadura) así como dado el caso de un sistema de tampón (preferentemente hidrogenofosfato disódico y ácido cítrico). La biosíntesis se llevó a cabo a 28-30 °C durante 3-21 días y se probó para un procedimiento de síntesis tanto discontinuo como para uno continuo. Con una relación 5:1 o 2:1 entre el medio nutriente y las cepas bacterianas se consigue un sistema de fases de BNC homogéneo combinado común, transparente y muy estable (véase la Figura 1) a partir de las dos redes de BNC sintetizadas. La denominada relación de inoculación (relación de las cepas bacterianas inoculadas entre sí) es 50:50 (ATCC 23769 : DSM 11804), es decir, las cepas bacterianas se incorporan en la síntesis en las mismas proporciones de cantidades. Un cambio de esta relación de inoculación posibilitaría adicionalmente un control del sistema de poros y, por tanto, de la estabilidad así como una influencia en la transparencia del material de BNC homogéneo. Con la relación de inoculación de 10:90 se mostró por ejemplo la formación de un no tejido de BNC sólido/estable, translúcido y al mismo tiempo elástico. Mediante un cambio opuesto de esta relación de inoculación (por ejemplo 90:1) se pueden reducir tanto la resistencia como la elasticidad con conservación de la transparencia.

30 Además, mediante la adición de ácido acético glacial en hasta el 2 % se puede mejorar adicionalmente la homogeneidad del biomaterial de BNC producido.

35 En la Figura 2 está representado un biomaterial de BNC que, tal como se ha propuesto, se compone así mismo de dos redes diferentes de celulosa bacteriana que, sin embargo, se sintetizó hasta dar un sistema de fases en forma de capas especial, correspondiéndose dos fases individuales independientes (2, 3) en cada caso con un no tejido de BNC respectivo de la correspondiente cepa bacteriana y sus propiedades en sí conocidas y ambas fases individuales (2, 3) están unidas firmemente entre sí a través de una fase homogénea combinada (1).

40 Este sistema de fases especial se sintetiza a partir de las dos cepas de *Gluconacetobacter* ATCC 23769 y DSM 14666 o a su vez en dicho recipiente de cultivo no representado con una superficie de síntesis de 7 cm². Mediante cambio de esta superficie de síntesis se puede influir de forma dirigida durante este cultivo en la formación de las fases individuales 2, 3, prefiriéndose con aumento de superficie (relación de inoculación de 50:50) la configuración de la fase individual 2 (correspondiente a la cepa bacteriana DSM 14666) frente a la fase individual 3 (correspondiente a la cepa bacteriana ATCC 23769). El sistema de fases representado en la Figura 2 del biomaterial de BNC se consigue mediante el uso de las cepas bacterianas mencionadas así como mediante su preparación por separado y su posterior inoculación conjunta. Por el contrario, un cultivo conjunto de esas cepas bacterianas, inclusive la preparación conjunta, configuraría un sistema de fases homogéneo combinado (compárese con la Figura 1).

50 Como medio de cultivo se emplea también aquí una mezcla de una fuente de carbono (preferentemente distintos azúcares y sus derivados), de una fuente de nitrógeno (preferentemente peptona), de una fuente de vitaminas (preferentemente extracto de levadura) así como dado el caso de un sistema de tampón (preferentemente hidrogenofosfato disódico y ácido cítrico). La biosíntesis se llevó a cabo a 28-30 °C durante 3-21 días con una relación de 20:1 entre el medio nutriente y las cepas bacterianas y se probó para un procedimiento de síntesis tanto discontinuo como para uno continuo. La relación de inoculación de 50:50 entre las cepas bacterianas conduce al sistema de fases de BNC en forma de capas visible desde el exterior (Figura 3) con dichas dos fases individuales 2, 3 y la fase homogénea 1 que se encuentra en medio. Además, las fases individuales en el caso de esta relación de inoculación están presentes a partes iguales. En función del desplazamiento de la relación de inoculación a favor de una cepa bacteriana se puede influir de forma dirigida en cada caso en el espesor de las fases individuales 2, 3 así como en las propiedades resultantes (capacidad de absorción de agua y de retención de agua etc.).

Enumeración de las referencias usadas

- 1 - fase homogénea combinada
- 2, 3 - fase individual independiente

REIVINDICACIONES

- 5 1. Biomateriales multifásicos a base de nanocelulosa sintetizada por bacterias (BNC), compuestos de al menos dos redes diferentes de celulosa bacteriana, **caracterizados por que** las al menos dos redes diferentes de celulosa bacteriana están configuradas como sistema de fases homogéneo combinado (1) o como sistema de fases en forma de capas, compuesto de al menos una fase homogénea combinada (1) así como al menos una fase individual (2, 3).
- 10 2. Procedimiento para la producción de biomateriales multifásicos a base de nanocelulosa sintetizada por bacterias (BNC), en el que se sintetizan al menos dos cepas bacterianas productoras de celulosa diferentes preparadas conjuntamente o por separado entre sí hasta dar varias redes diferentes de celulosa bacteriana en un medio de cultivo común, determinándose mediante la selección de las al menos dos cepas bacterianas diferentes, mediante su preparación e inoculación así como mediante la influencia en las condiciones de síntesis la estructura de BNC y las propiedades de BNC de los biomateriales multifásicos, sintetizándose las redes de celulosa bacteriana como sistema de fases homogéneo combinado (1) o como sistema de fases en forma de capas compuesto de al menos una fase homogénea combinada (1) así como al menos una fase individual (2, 3).
- 15 3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, **caracterizado por que** las al menos dos redes diferentes de celulosa bacteriana se preparan de forma independiente entre sí y a continuación se agrupan y se sintetizan conjuntamente.
4. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, **caracterizado por que** las al menos dos redes diferentes de celulosa bacteriana se agrupan para la síntesis común ya antes de la inoculación.



Fig. 1



Fig. 2