

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 714 083**

51 Int. Cl.:

**A01H 4/00** (2006.01)

**A01G 31/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.12.2015 PCT/EP2015/079490**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.06.2016 WO16092098**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.12.2015 E 15813317 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.11.2018 EP 3229583**

54 Título: **Biorreactor**

30 Prioridad:  
**11.12.2014 GB 201421992**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**27.05.2019**

73 Titular/es:  
**EVONIK ADVANCED BOTANICALS SAS (100.0%)  
4 rue Pierre Fontaine  
91058 Evry, FR**

72 Inventor/es:  
**MICHOUX, FRANCK y  
BOEHM, MARKO**

74 Agente/Representante:  
**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 714 083 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**

Biorreactor

La invención se refiere a un biorreactor para la producción in vitro de biomasa vegetal diferenciada, tales como brotes o raíces, por inmersión temporal.

5 La micropropagación convencional para producir biomasa vegetal diferenciada es generalmente costosa y requiere mucha mano de obra. Por lo tanto, se han desarrollado diversos tipos de recipientes para el cultivo in vitro de plantas con el fin de superar estos problemas. Las metodologías utilizadas en estos recipientes se pueden dividir aproximadamente en cuatro tipos: biorreactores de fase líquida, de fase gaseosa, híbridos y sistemas de inmersión temporal (TIS, por sus siglas en inglés).

10 El documento EP 2 617 282 A1 describe un dispositivo de inmersión temporal y un método para la producción in vitro de material vegetal, en el que el dispositivo comprende un recipiente cerrado que define una cámara exterior que recibe a un miembro de soporte que define una cámara de crecimiento interior para material vegetal, comprendiendo el dispositivo, además, una herramienta de accionamiento neumático capaz de mover la cámara de crecimiento dentro de la cámara exterior entre una primera posición bajada y una segunda posición elevada.

15 Un sistema de inmersión temporal es un sistema de cultivo periódico, semiautomático o totalmente automatizado basado en ciclos alternos de inmersión temporal del tejido vegetal cultivado en un medio líquido, seguido de drenaje y exposición del tejido vegetal a un entorno gaseoso. Habitualmente, el período de inmersión es relativamente corto, en la región de unos pocos minutos, mientras que el período de exposición al aire es prolongado, en la región de varias horas. Al ajustar la duración de los períodos de inmersión y exposición, es posible crear condiciones para una  
 20 humedad óptima y suministrar nutrientes con un mínimo contacto con el líquido, lo que posibilita reducir significativamente la hiperhidricidad del tejido vegetal cultivado.

Además de reducir la hiperhidricidad del tejido vegetal cultivado, los sistemas de inmersión temporal se consideran los mejores para la producción de tejido vegetal diferenciado, porque producen más plantas por metro cuadrado. Tienen tasas de multiplicación más altas y el uso de un medio líquido reduce los costos de agar. La inmersión  
 25 temporal resulta en una mayor absorción y asimilación de nutrientes, y la ventilación forzada aumenta el crecimiento y la producción de biomasa. Manipulaciones reducidas y costos laborales reducidos son otra ventaja, junto con una calidad mejorada de la planta y la producción de mayores rendimientos en peso fresco y seco.

De acuerdo con un aspecto de la invención y como se define en la reivindicación 1 independiente, se proporciona un biorreactor de inmersión temporal para la producción in vitro de biomasa vegetal diferenciada, que comprende:

30 una cámara de crecimiento que tiene una o más paredes laterales transparentes y un fondo de malla, definiendo el fondo de malla una pluralidad de poros para recibir material vegetal;

una bolsa flexible formada a partir de un material transparente, teniendo la bolsa flexible una abertura sellable y que está dimensionada para recibir la cámara de crecimiento junto con un medio líquido;

35 una cámara exterior que tiene una o más paredes laterales transparentes, estando formada la cámara exterior para corresponder en forma a la cámara de crecimiento y dimensionada para recibir la cámara de crecimiento dentro de la bolsa flexible, de modo que el fondo de malla de la cámara de crecimiento esté orientado hacia el fondo de la cámara exterior y el movimiento de la cámara de crecimiento dentro de la cámara exterior está restringido al movimiento a lo largo de un solo eje, de modo que el fondo de malla de la cámara de crecimiento se mueva hacia y desde la parte inferior de la cámara exterior; y

40 un mecanismo de accionamiento dispuesto para impulsar selectivamente el movimiento de la cámara de crecimiento a lo largo de un solo eje, cuando la cámara de crecimiento y la bolsa flexible se reciben en la cámara exterior, entre una primera posición en la que el fondo de malla de la cámara de crecimiento está ubicado en o hacia la parte inferior de la cámara exterior, y una segunda posición en la que el fondo de malla de la cámara de crecimiento está separado de la parte inferior de la cámara exterior.

45 Se apreciará que, en uso, el fondo de la cámara exterior está destinado a apoyarse sobre una superficie de soporte.

Cuando la bolsa flexible que contiene un medio líquido y la cámara de crecimiento está ubicada en la cámara exterior, el medio líquido se acumulará inevitablemente en el fondo de la bolsa flexible, junto al fondo de la cámara de crecimiento. Por consiguiente, la provisión de un mecanismo de accionamiento para impulsar selectivamente el movimiento de la cámara de crecimiento a lo largo del eje único entre las posiciones primera y segunda en la  
 50 cámara exterior permite la inmersión temporal de la cámara de crecimiento en el medio líquido.

El uso de un mecanismo de accionamiento para efectuar una inmersión temporal de la cámara de crecimiento es ventajoso, porque permite fácilmente que el biorreactor se amplíe para operar a una escala relativamente grande.

5 En uso, la primera posición del fondo de malla de la cámara de crecimiento debe estar lo suficientemente próxima a la parte inferior de la cámara exterior para sumergir los poros de la malla en el medio líquido contenido en la bolsa flexible en el fondo de la cámara exterior. Se apreciará, por lo tanto, que en esta primera posición, el fondo de malla no necesita estar ubicado exactamente en el fondo de la cámara exterior. Puede estar separado del fondo de la cámara exterior.

10 En la segunda posición, el fondo de malla se debe alejar del fondo de la cámara exterior con el fin de levantar el fondo de malla de la cámara de crecimiento del medio líquido. Las ubicaciones exactas de la primera y segunda posiciones dependerán, por lo tanto, de la profundidad del medio líquido que se acumula en la bolsa flexible en el fondo de la cámara exterior. Sin embargo, se apreciará que el fondo de malla en la segunda posición estará más alejado del fondo de la cámara exterior que cuando está ubicado en la primera posición.

15 El fondo de malla de la cámara de crecimiento permite fácilmente la entrada del medio líquido en la cámara de crecimiento cuando la cámara de crecimiento se mueve a la primera posición y se sumerge en el medio líquido. De manera similar, el fondo de malla permite que el medio líquido se drene de la cámara de crecimiento cuando la cámara de crecimiento se mueve a la segunda posición y se retira del medio líquido. Por consiguiente, el uso de un fondo de malla permite un flujo eficiente de medio líquido dentro y fuera de los poros.

20 En biorreactores convencionales que utilizan inmersión temporal, el medio líquido se mueve sobre el material vegetal para sumergir el material vegetal. El medio líquido se mueve mecánicamente o por presión de aire, utilizando un compresor de aire, por ejemplo. Este enfoque no solo introduce el riesgo de que el medio líquido se desborde del soporte que contiene el material vegetal y, por lo tanto, el riesgo de que el material vegetal sea eliminado por lavado del soporte, sino que la demanda de alta energía y presión relativamente alta necesaria para circular el medio líquido en metodologías de este tipo hace que no sea práctico aumentar el tamaño y la capacidad de los biorreactores. Por consiguiente, los biorreactores convencionales que utilizan inmersión temporal solo pueden operar a escala de laboratorio, limitándose típicamente a un volumen máximo de 10 litros, y no permiten que la inmersión temporal se utilice para producir biomasa vegetal diferenciada a escala comercial.

30 En contraposición, la solicitante ha descubierto que el movimiento de accionamiento de la cámara de crecimiento relativamente ligero para sumergir el material vegetal contenido en la cámara de crecimiento en un medio líquido requiere significativamente menos energía y, por lo tanto, permite que el tamaño y la capacidad del biorreactor se amplíen hasta un volumen máximo en el intervalo de 10-1.000 litros, y preferiblemente un volumen máximo en el rango de 30-150 litros.

35 El uso de una bolsa flexible para contener herméticamente la cámara de crecimiento y, en uso, el medio líquido, no solo evita la entrada de contaminantes en el medio líquido, sino que también facilita la ampliación del biorreactor. El uso de una bolsa flexible puede, por ejemplo, permitir que la capacidad del biorreactor se incremente hasta 2.000 litros.

El uso de materiales transparentes para formar la cámara de crecimiento, la bolsa flexible y la cámara exterior permite que penetre la luz y alcance el material vegetal ubicado en los poros del fondo de malla de la cámara de crecimiento.

40 La cámara de crecimiento y la cámara exterior tienen cada una al menos una pared transparente para permitir que la luz penetre en la cámara de crecimiento y la cámara exterior. En realizaciones de la invención, se prevé que las otras paredes de la cámara pueden formarse a partir de un material sólido u opaco con el fin de controlar la cantidad de luz que puede penetrar en la cámara de crecimiento y la cámara exterior. Sin embargo, en realizaciones particularmente preferidas, todas las paredes de la cámara de crecimiento y la cámara exterior están formadas por un material transparente para permitir que una cantidad máxima de luz penetre en la cámara de crecimiento y la cámara exterior.

45 El número de paredes de la cámara de crecimiento y la cámara exterior dependerá, por supuesto, de la forma de las cámaras. En circunstancias en donde las cámaras son de forma circular o elíptica, solo se requerirá una pared. Con el fin de crear cámaras que tengan otras formas, las cámaras pueden tener dos, tres, cuatro, cinco o más paredes interconectadas.

50 La provisión de una cámara exterior para recibir la cámara de crecimiento sellada en la bolsa flexible con medio líquido reduce los huecos en el medio líquido y limita el movimiento de la cámara de crecimiento para permitir el movimiento en uso a lo largo del único eje, hacia dentro y hacia fuera del medio líquido.

5 En realizaciones particularmente preferidas de la invención, el único eje a lo largo del cual la cámara de crecimiento se mueve hacia dentro y hacia fuera del medio líquido será esencialmente vertical. Sin embargo, en otras realizaciones, está previsto que el eje único pueda extenderse en ángulo con respecto a la vertical, siendo el único requisito que el movimiento de la cámara de crecimiento a lo largo del eje mueva el fondo de malla de la cámara de crecimiento hacia y desde el fondo de la cámara exterior.

El gas se puede sellar en la bolsa flexible de modo que el material vegetal contenido en la cámara de crecimiento se exponga al gas cuando se mueve a la segunda posición y se elimina del medio líquido.

10 Preferiblemente, la bolsa flexible incluye una lumbrera sellable para recibir medio líquido y/o inóculo. Se apreciará que el medio líquido y el inóculo se pueden introducir en el biorreactor a través de la lumbrera sellable al mismo tiempo o por separado, dependiendo de las circunstancias. Por lo tanto, no es esencial que el medio líquido y el inóculo se introduzcan al mismo tiempo en el biorreactor a través de la lumbrera sellable.

15 La provisión de una lumbrera sellable, que típicamente tiene un diámetro en el intervalo de 0,5 - 5 cm, permite fácilmente la introducción de medio líquido e inóculo, según se requiera, en la bolsa flexible. También permite minimizar el riesgo de contaminación al tiempo que se aumenta el tamaño y la capacidad del biorreactor. Esto se debe a que solo la lumbrera sellable debe ubicarse dentro de un entorno estéril durante la introducción de medio líquido y/o inóculo en la bolsa flexible en lugar de todo el biorreactor.

20 Se apreciará que la contaminación desperdiciaría todo material vegetal contenido en el biorreactor. Por consiguiente, la capacidad de prevenir eficazmente el ingreso de contaminantes es particularmente importante cuando se considera la ampliación del tamaño y la capacidad del biorreactor. Cuanto mayor sea la capacidad del biorreactor, mayor será la cantidad de material vegetal que se desperdiciaría en caso de contaminación.

25 En ausencia de la lumbrera para introducir medio líquido y/o inóculo, sería necesario volver a abrir la abertura sellable de la bolsa flexible con el fin de introducir y reponer el medio líquido y/o introducir inóculo. Por consiguiente, con el fin de evitar la contaminación, sería necesario que al menos toda la abertura y muy probablemente todo el biorreactor esté ubicado en un entorno estéril. El entorno estéril se proporciona típicamente mediante el uso de una campana de flujo laminar. Se apreciará, por lo tanto, que, en este tipo de disposiciones, el tamaño de la campana de flujo laminar limitaría el tamaño máximo y la capacidad del biorreactor.

30 Limitaciones de este tipo no existen cuando se proporciona una lumbrera sellable para introducir medio líquido y/o inóculo. Esto se debe a que, una vez que la cámara de crecimiento se encuentra dentro de la bolsa flexible en la configuración inicial del biorreactor, no es necesario volver a abrir la abertura sellable de la bolsa flexible. Por consiguiente, tal como se esboza arriba, solo la lumbrera sellable debe ubicarse en el entorno estéril para evitar el ingreso de contaminantes cuando se introduce medio líquido y/o inóculo en el biorreactor, y el resto del biorreactor puede ubicarse fuera del entorno estéril.

35 En realizaciones preferidas, el biorreactor puede incluir, además, una bomba de aire para la conexión a la bolsa flexible para permitir que un gas sea transportado a través de la bolsa flexible. La creación de un flujo de gas a través de la bolsa flexible, en uso, mejora la ventilación del material vegetal ubicado en los poros del fondo de malla de la cámara de crecimiento cuando la cámara de crecimiento se retira del medio líquido.

40 En realizaciones de este tipo, la bolsa flexible incluye preferiblemente al menos tres lumbreras, la primera y la segunda lumbrera están configuradas para la conexión a la bomba de aire para permitir el flujo de gas dentro y fuera de la bolsa flexible, mientras que la tercera lumbrera está configurada para recibir el medio líquido e inóculo a través de la misma.

45 El mecanismo de accionamiento proporcionado para impulsar el movimiento de la cámara de crecimiento puede incluir un brazo de accionamiento ubicado dentro de la cámara exterior para aplicarse a un lado inferior del fondo de malla de la cámara de crecimiento, a través de la bolsa flexible, cuando la cámara de crecimiento y la bolsa flexible están alojadas en la cámara exterior. El brazo de accionamiento en tales realizaciones se puede mover en una primera dirección a lo largo del eje único hacia arriba desde la parte inferior de la cámara exterior hasta una posición extendida con el fin de empujar la cámara de crecimiento desde la primera posición hasta la segunda posición. El brazo de accionamiento se puede mover desde esta posición extendida en una segunda dirección opuesta a lo largo del eje único para guiar el movimiento de la cámara de crecimiento hacia abajo desde la segunda posición hasta la primera posición.

50 Se apreciará que, en este tipo de realizaciones, el brazo de accionamiento no se aplica en toda la cara inferior del fondo de malla de la cámara de crecimiento para permitir que el medio líquido drene desde la cámara de crecimiento hacia bolsillos en la bolsa flexible formados en los lados opuestos del brazo de accionamiento a medida que el brazo

de accionamiento se mueve hacia arriba, hacia la posición extendida, para impulsar el movimiento de la cámara de crecimiento desde la primera posición hasta la segunda posición.

5 En el movimiento hacia abajo del brazo de accionamiento, los bolsillos en la bolsa flexible a cada lado del brazo de accionamiento se reducen en profundidad hasta que la cámara de crecimiento alcanza la primera posición en la parte inferior de la cámara exterior y se sumerge en medio líquido recogido en la bolsa flexible, por encima del brazo de accionamiento, a lo largo de toda la anchura de la cámara exterior.

10 Si bien se puede utilizar una bomba de vacío para impulsar el movimiento del brazo de accionamiento, las bombas de vacío consumen mucha energía y aumentan en gran medida el consumo de energía en la ampliación del biorreactor. En realizaciones preferidas, por lo tanto, se utilizan uno o más motores eléctricos para impulsar el movimiento del brazo de accionamiento y, por lo tanto, para impulsar el movimiento de la cámara de crecimiento. En otras realizaciones, el mecanismo de accionamiento puede incluir un elemento flotante montado para extenderse alrededor del fondo de malla de la cámara de crecimiento y, con ello, permitir que la cámara de crecimiento flote en un medio líquido contenido en la bolsa flexible cuando se reciben la cámara de crecimiento y la bolsa flexible en la cámara exterior y ubicar así la cámara de crecimiento en la segunda posición.

15 Con el fin de sumergir la cámara de crecimiento en el medio líquido cuando se requiera, el mecanismo de accionamiento en este tipo de realizaciones incluye, además, uno o más elementos de accionamiento previstos en la cámara exterior para aplicarse selectivamente en la cámara de crecimiento e impulsar el movimiento de la cámara de crecimiento hacia abajo desde la segunda posición a la primera posición.

20 El elemento flotante puede tener una profundidad de al menos 5 cm, de modo que sobresalga al menos 5 cm por debajo del fondo de malla de la cámara de crecimiento, de modo que, cuando la cámara de crecimiento flota en un medio líquido, el fondo de malla de la cámara de crecimiento está separado al menos 5 cm desde la superficie del medio líquido. Separar el fondo de malla de la superficie del medio líquido cuando la cámara de crecimiento está en la segunda posición es ventajoso porque reduce el riesgo de que las raíces o brotes de la planta sobresalgan por debajo del fondo de malla y permanezcan sumergidos en el medio líquido.

25 En realizaciones particularmente preferidas, el elemento flotante tiene una profundidad de 10 cm.

30 En otras realizaciones, el mecanismo de accionamiento puede incluir al menos dos electroimanes para ubicar la cámara de crecimiento en la segunda posición. En realizaciones de este tipo, al menos dos electroimanes pueden ubicarse dentro de la cámara externa, hacia el fondo de la cámara externa, y al menos dos electroimanes pueden ubicarse en una superficie externa de la cámara de crecimiento, en la vecindad del fondo de malla de la cámara de crecimiento. En realizaciones de este tipo, los electroimanes se pueden hacer funcionar de forma selectiva para crear campos magnéticos opuestos. La creación de campos magnéticos opuestos sirve para impulsar el movimiento de la cámara de crecimiento en la primera dirección a lo largo del eje único, hacia arriba desde la primera posición a la segunda posición.

35 Como con las realizaciones en las que el mecanismo de accionamiento incluye un elemento flotante, el mecanismo de activación en este tipo de realizaciones incluye, además, uno o más elementos de accionamiento previstos en la cámara externa para aplicarse selectivamente en la cámara de crecimiento e impulsar el movimiento de la cámara de crecimiento hacia abajo desde la segunda posición hasta la primera posición cuando se requiere la inmersión de la cámara de crecimiento en el medio líquido.

40 En realizaciones en las que el mecanismo de accionamiento incluye un miembro flotante o electroimanes opuestos para mantener la cámara de crecimiento en la segunda posición, se puede proporcionar el o cada uno de los miembros de accionamiento para impulsar el movimiento de la cámara de crecimiento hacia abajo cuando se requiere la inmersión en el medio líquido en forma de un émbolo situado dentro de la cámara externa. El o cada uno de los émbolos tiene un miembro de aplicación para aplicar un borde superior de la o al menos una pared lateral de la cámara de crecimiento, a través de la bolsa flexible, cuando la cámara de crecimiento y la bolsa flexible están alojadas en la cámara externa. El o cada uno de los émbolos se puede mover para impulsar el movimiento del respectivo miembro de aplicación a lo largo del eje único hacia abajo desde la parte superior de la cámara externa, desde una posición de reposo hasta una posición extendida y, con ello, impulsar el movimiento de la cámara de crecimiento desde la segunda posición hasta la primera posición. El o cada uno de los émbolos es móvil para impulsar el movimiento del miembro de acoplamiento respectivo desde esta posición extendida en una segunda dirección opuesta a lo largo del eje único para guiar el movimiento de la cámara de crecimiento hacia arriba desde la primera posición a la segunda posición bajo la acción del miembro flotante o electroimanes opuestos.

50 Preferiblemente, en realizaciones de este tipo, el mecanismo de accionamiento incluye al menos tres émbolos de este tipo ubicados dentro de la cámara externa en ubicaciones separadas equidistantemente alrededor de una

- 5      circunferencia interna de la cámara externa. Una disposición de este tipo permite que el mecanismo de accionamiento aplique una fuerza de accionamiento hacia abajo por igual en ubicaciones separadas alrededor de la cámara de crecimiento y, con ello, reduce el riesgo de que se aplique una fuerza de giro a la cámara de crecimiento, lo que de otro modo podría evitar un movimiento suave hacia abajo de la cámara de crecimiento dentro de la cámara de crecimiento externa.
- En realizaciones de este tipo, cada uno de los émbolos puede alojarse dentro de un alojamiento sellado del émbolo e impulsarse por cambios en la presión en un fluido contenido dentro del alojamiento para actuar sobre un extremo del émbolo y, con ello, impulsar el movimiento del émbolo fuera del alojamiento. en un aumento de la presión y provocar la retracción del émbolo en una disminución de la presión.
- 10     En otras realizaciones de este tipo, cada uno de los émbolos puede accionarse por medio de un motor eléctrico.
- En otras realizaciones en las que el mecanismo de accionamiento incluye un miembro flotante para mantener la cámara de crecimiento en la segunda posición, el mecanismo de accionamiento también puede incluir electroimanes para impulsar el movimiento de la cámara de crecimiento hacia abajo cuando se requiere la inmersión en el medio líquido. En tales realizaciones, al menos dos electroimanes pueden ubicarse dentro de la cámara externa, hacia el fondo de la cámara externa, y al menos dos electroimanes ubicados en una superficie externa de la cámara de crecimiento, en la vecindad del fondo de malla de la cámara de crecimiento. Los electroimanes se pueden hacer funcionar de forma selectiva para crear campos magnéticos atrayentes y, con ello, impulsar el movimiento de la cámara de crecimiento en la segunda dirección a lo largo del eje único, hacia abajo desde la segunda posición hasta la primera posición. Al retirar los campos magnéticos atrayentes, al apagar los electroimanes, el miembro flotante provoca un movimiento ascendente de la cámara de crecimiento desde la primera posición hasta la segunda posición.
- 15     Se apreciará que en cada una de las realizaciones a las que se alude arriba, el mecanismo de accionamiento incluye preferiblemente un temporizador para controlar la activación y desactivación del brazo de accionamiento, los electroimanes y/o el o los émbolos y, con ello, en uso, controlar el movimiento de la cámara de crecimiento entre la primera y la segunda posiciones. Mediante el ajuste apropiado del temporizador, es posible establecer períodos específicos de inmersión y ventilación según sea necesario para un material vegetal particular ubicado en los poros del fondo de malla de la cámara de crecimiento.
- 20     Con el fin de garantizar un funcionamiento eficaz, la bolsa flexible se forma preferiblemente a partir de un polímero termoplástico flexible, tal como polipropileno, polietileno y poliuretano, por ejemplo. También se prevé que se puedan utilizar otros materiales poliméricos adecuados para formar una lámina transparente de material flexible para formar la bolsa flexible.
- 25     Las cámaras de crecimiento y externa pueden fabricarse moldeando o configurando un material plástico transparente en su forma final, seleccionándose el material plástico de polímeros sintéticos o naturales. En otras realizaciones, las cámaras de crecimiento y externa pueden fabricarse a partir de una resina transparente utilizando una impresora 3D.
- 30     Se prevé que se podrían utilizar otros materiales para hacer una de las partes componentes, o todas las partes componentes, del biorreactor. Por ejemplo, para mejorar el respeto al medio ambiente del biorreactor, se podrían utilizar materiales biodegradables o reciclables apropiados.
- 35     Para permitir que la cámara externa guíe el movimiento de la cámara de crecimiento de manera eficaz en uso, las formas en sección transversal de la cámara de crecimiento y la cámara externa, en un plano generalmente perpendicular al eje único, son las mismas. Siempre que la forma de la sección transversal de las dos cámaras sea la misma, las cámaras pueden formarse para definir cualquier forma de la sección transversal que incluya, por ejemplo, circular, elíptica, cuadrada, triangular o rectangular.
- 40     Se apreciará que en realizaciones en las que la cámara de crecimiento y la cámara externa definen una sección transversal circular, cada una de las cámaras incluirá una pared lateral única y continua.
- 45     La parte inferior de la malla de la cámara de crecimiento se puede formar a partir de un material plástico o metálico, formándose la malla preferiblemente para definir poros que tengan un tamaño en el intervalo de 50-500  $\mu\text{m}$  y más preferiblemente en el intervalo de 100-200  $\mu\text{m}$ .
- 50     Con el fin de evitar que el medio líquido se desborde de la cámara de crecimiento en circunstancias en las que el material vegetal ubicado en los poros del fondo de malla de la cámara de crecimiento ha crecido para bloquear los poros, y con ello prevenir el drenaje del medio líquido a través de los poros, la cámara de crecimiento puede incluir

una sección de malla ubicada en la pared lateral o en una de ellas. La sección de malla se forma preferiblemente del mismo material y tiene el mismo tamaño de poro que el fondo de malla de la cámara de crecimiento, y se ubica preferiblemente en o hacia un borde de la pared lateral que está separado del fondo de malla.

5 Con el fin de permitir el uso del biorreactor para producir biomasa vegetal a escala comercial, la cámara de crecimiento se forma preferiblemente para definir un volumen interno en el intervalo de 10-1.000 litros y más preferiblemente en el intervalo de 30-150 litros.

A continuación se describirán realizaciones preferidas de la invención, a modo de ejemplos no limitativos, con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

- 10 Las Figuras 1 y 2 muestran ilustraciones esquemáticas de un biorreactor de inmersión temporal de acuerdo con una primera realización de la invención;
- la Figura 3 muestra el brazo de accionamiento del biorreactor de las Figuras 1 y 2;
- las Figuras 4a y 4b muestran una cámara de crecimiento del biorreactor de las Figuras 1 y 2;
- las Figuras 5a y 5b muestran la cámara de crecimiento y una bolsa flexible del biorreactor de las Figuras 1 y 2;
- 15 las Figuras 6a y 6b muestran la cámara de crecimiento, la bolsa flexible y una cámara externa del biorreactor de las Figuras 1 y 2;
- las Figuras 7 y 8 muestran ilustraciones esquemáticas de un biorreactor de inmersión temporal de acuerdo con una segunda realización de la invención;
- 20 la Figura 9 ilustra la tasa de crecimiento de la biomasa de hoja utilizando el biorreactor de las Figuras 1 y 2;
- la Figura 10 muestra la biomasa de hoja de *Nicotiana tabacum* producida utilizando el biorreactor de las Figuras 1 y 2.

En las Figuras 1 y 2 se muestra un biorreactor de inmersión temporal 10 para la producción in vitro de biomasa vegetal diferenciada, de acuerdo con una realización de la invención.

25 El biorreactor 10 incluye una cámara de crecimiento 12 (Figuras 4a y 4b) que tiene una pluralidad de paredes laterales transparentes 14 y un fondo de malla 16 que define una pluralidad de poros 18 para recibir material vegetal o inóculo. Está previsto que el material vegetal o el inóculo puedan incluir hojas o fragmentos de raíces, suspensiones celulares o callos.

30 La cámara de crecimiento 12 está ubicada en una bolsa flexible 20 (Figuras 5a y 5b) formada de un material transparente. La bolsa flexible 20 incluye una abertura sellable (no mostrada) y está dimensionada para recibir la cámara de crecimiento 12 junto con un medio líquido 22.

La bolsa flexible 20, junto con la cámara de crecimiento 12 y el medio líquido 22, están ubicados en una cámara externa 24 (Figuras 6a y 6b). La cámara externa 24 tiene una pluralidad de paredes laterales transparentes 26 y un fondo 28 que, en uso, está destinado a apoyarse sobre una superficie de soporte.

35 El biorreactor 10 incluye, además, un mecanismo de accionamiento en forma de un brazo de accionamiento 30 (Figuras 1 y 2) situado hacia el fondo 28 de la cámara externa 24. El brazo de accionamiento 30 se aplica en la cara inferior del fondo de malla 16 de la cámara de crecimiento 12 a través de la bolsa flexible 20.

40 Preferiblemente, el brazo de accionamiento 30 está configurado para presentar una porción de acoplamiento 31 relativamente suave (Figura 3) que se aplica en la cara inferior de la parte inferior de la malla 16 de la cámara de crecimiento 12 a través de la bolsa flexible 20. La provisión de una porción de acoplamiento 31 relativamente suave, que no tiene bordes afilados o salientes, reduce el riesgo de que el brazo de accionamiento 30 se desgarre o rompa de otra manera la bolsa flexible 20.

45 Tal como se muestra en las Figuras 1 y 2, el brazo de accionamiento 30 no se aplica en toda la cara inferior del fondo de malla 16 de la cámara de crecimiento 12. El brazo de accionamiento 30 se aplica en una proporción relativamente pequeña de la cara inferior del fondo de malla 16, en cuyo punto la bolsa flexible 20 queda atrapada entre el brazo de accionamiento 30 y el fondo de malla 16. Como resultado, se forman dos bolsillos 32, 34 a cada lado del brazo de accionamiento 30 en el que fluye el medio líquido 22.

## ES 2 714 083 T3

La cámara de crecimiento 12, la bolsa flexible 20 y la cámara externa 24 están formadas cada una de un material transparente para permitir que la luz penetre y alcance cualquier material vegetal situado en los poros 18 del fondo de malla 16 de la cámara de crecimiento 12.

5 Preferiblemente, la bolsa flexible 20 está formada de un material desechable para permitir la eliminación de la bolsa 20 después de su uso.

En la realización mostrada en las Figuras 1 y 2, la bolsa flexible 20 está formada de polipropileno. En otras realizaciones, la bolsa flexible 20 puede formarse a partir de otro polímero termoplástico flexible, tal como polietileno o poliuretano.

10 La ubicación de la bolsa flexible 20 que contiene la cámara de crecimiento 12 y el medio líquido 22 en una cámara externa 24 permite que el medio líquido 22 se asiente dentro de la bolsa flexible 20 en la parte inferior de la cámara externa 24, tal como se muestra en las Figuras 1 y 2. Esta disposición elimina los huecos que se forman en el medio líquido 22.

15 La cámara de crecimiento 12 y la cámara externa 24 están ambas moldeadas a partir de un material plástico de polietileno transparente, para definir una sección transversal rectangular en un plano generalmente perpendicular al eje A.

En otras realizaciones, la cámara de crecimiento 12 y la cámara exterior 24 pueden formarse a partir de plexi glass, vidrio u otro material transparente que pueda soportar la esterilización por radiación química, autoclave o gamma.

20 Está previsto que, en otras realizaciones, la cámara de crecimiento 12 y la cámara externa 24 puedan estar formadas de modo que definan una forma de sección transversal diferente en un plano generalmente perpendicular al eje A. La forma de sección transversal podría, por ejemplo, ser circular, elíptica, triangular o cuadrada.

La cámara de crecimiento 12 del biorreactor 10 mostrada en las Figuras 1 y 2 está dimensionada para que tenga una altura  $Y_a$  de 25 cm, una anchura  $X_a$  de 60 cm y una profundidad  $Z_a$  de 40 cm (los ejes X-Y-Z se ilustran en la Figura 3a). Esto da como resultado una cámara de crecimiento 12 que tiene un volumen interno de 60 litros

25 Está previsto que, en otras realizaciones, la anchura X y la profundidad Z de la cámara de crecimiento 12 pueda variarse para alterar el volumen interno máximo de la cámara de crecimiento 12. Sin embargo, la solicitante ha descubierto que la altura Y de la cámara de crecimiento 12 no debería exceda los 25 cm si la luz es suficiente para alcanzar el material vegetal o el inóculo.

30 La cámara externa 24 está dimensionada para tener una altura  $Y_b$  de 60 cm, una anchura  $X_b$  de 70 cm y una profundidad  $X_b$  de 50 cm (Figura 6a). Estas dimensiones permiten un espacio libre de 5 cm en cada lado de la cámara de crecimiento 12 en las direcciones de anchura X y profundidad Z cuando la cámara de crecimiento 12 y la bolsa flexible 20 están ubicadas en la cámara externa 24, tal como se muestra en las Figuras 1 y 2.

35 Las formas correspondientes de la cámara de crecimiento 12 y la cámara externa 24, y las dimensiones relativas de las cámaras de 12, 26 de la anchura X y profundidad Z significa que la cámara de crecimiento 12 se ajusta perfectamente dentro de las paredes laterales 28 de la cámara externa 24, restringiendo así el movimiento de la cámara de crecimiento 12 dentro de la cámara externa 24 al movimiento a lo largo de un solo eje A, que es esencialmente paralelo a la altura  $Y_a$ ,  $Y_b$  en la dirección de las dos cámaras 12, 26.

40 El biorreactor 10 mostrado en las Figuras 1 y 2 incluye una bomba de gas (no mostrada) para crear, en uso, un flujo de gas a través del volumen interno de la bolsa flexible 20. Para facilitar la conexión de la bomba de aire, la bolsa flexible 20 incluye primera y segunda lumbreras 38,40 configuradas para definir una entrada y una salida para la conexión a la bomba de aire para permitir el flujo de gas dentro y fuera de la bolsa flexible 20.

En uso, la bomba de aire puede ser activada para soplar aire en la bolsa flexible 20 sellada en el inicio del proceso del biorreactor. La bomba de aire se puede utilizar para renovar el aire en la bolsa flexible 20 a intervalos de tiempo que oscilan desde cada 1 hora hasta cada 6 horas, dependiendo de las especificaciones de la planta, y preferiblemente cada 1 a 2 horas.

45 El volumen de aire bombeado en la bolsa flexible 20 es de entre 2 litros por minuto y 20 litros por minuto, y el aire se bombea desde cualquier lugar entre 1 a 60 minutos cada vez.

La bolsa flexible incluye también una tercera lumbrera 42 configurada para recibir medio líquido, proporcionando con ello medios para introducir el medio líquido 22 en la bolsa flexible 20. La tercera lumbrera 42 se puede utilizar

entonces para introducir material vegetal o inóculo en la bolsa flexible 20. Preferiblemente, la cantidad de inóculo introducido en la bolsa flexible 20 está en el intervalo de 1 a 10 g por litro del volumen interno de la cámara de crecimiento 12.

5 La provisión de la tercera lumbrera 42 es ventajosa, porque significa que no es necesario sellar la cámara de crecimiento 12 en la bolsa flexible 20 junto con el medio líquido 22 o el material vegetal o inóculo al construir el biorreactor 10. La introducción del medio líquido 22 y el material vegetal o el inóculo puede demorarse hasta que el biorreactor esté completamente construido y listo para su uso.

10 Esto a su vez significa que solo es necesario ubicar la tercera lumbrera 42 dentro de un entorno estéril durante la introducción del medio líquido 22 y/o material vegetal o inóculo en el biorreactor 10. No es necesario ubicar la totalidad del biorreactor 10 en el entorno estéril y, por consiguiente, el tamaño del entorno estéril no limita el tamaño y la capacidad máximos del biorreactor 10.

El fondo de malla 16 de la cámara de crecimiento 12 está hecho de acero inoxidable para definir poros 18 que tienen un tamaño en el intervalo de 50-200  $\mu\text{m}$ , preferiblemente 100  $\mu\text{m}$ , de modo que les permita retener las células más pequeñas.

15 La cámara de crecimiento 12 también incluye una sección de malla 36 situada a lo largo de un borde superior de una pared lateral 14. La sección de malla 36 también está hecha de acero inoxidable y está formada para definir poros (no mostrados) que corresponden en tamaño a los poros 18 formados en el fondo de malla 16 de la cámara de crecimiento 12.

20 En uso, el brazo de accionamiento 30 es móvil entre una posición de reposo en la que el brazo móvil se encuentra junto a la parte inferior 28 de la cámara externa 24 (Figura 2), hacia arriba a lo largo de un eje A, a una posición extendida en la que el brazo móvil está separado de la parte inferior 28 de la cámara externa 24 (Figura 1). Como resultado, el brazo de accionamiento 30 impulsa el movimiento de la cámara de crecimiento 12 a lo largo del eje A desde una primera posición en la que el fondo de malla 16 está ubicado hacia el fondo 28 de la cámara externa 24 (Figura 2) hacia una segunda posición en la que el fondo de malla 16 está separado del fondo 26 de la cámara externa 28 (Figura 1)

Durante el movimiento del brazo de accionamiento 30, los bolsillos 32,34 formados en la bolsa flexible 20 a cada lado del brazo de accionamiento 30 aumentan en profundidad y medio líquido 22 se drena de la cámara de crecimiento 12 en esos bolsillos 32,34.

30 La cantidad de medio líquido 22 dispuesto en la bolsa flexible 20 se elige de tal manera que, cuando la cámara de crecimiento 12 se encuentra en la primera posición, todo material vegetal situado en los poros 18 del fondo de malla 16 de la cámara de crecimiento 12 se sumerge dentro del medio líquido 22.

35 La cantidad de medio líquido 22 proporcionada en la bolsa flexible 20 y la posición extendida del brazo de accionamiento 30 se eligen preferiblemente de tal manera que, cuando la cámara de crecimiento 12 se encuentra en la segunda posición, el fondo de malla 16 de la cámara de crecimiento 12 está separado de una superficie superior del medio líquido 22 por una distancia  $\Delta$  (Figura 1). Esto asegura que el medio líquido 22 se drene de la cámara de crecimiento 12. También garantiza que todo brote o raíz de la planta que sobresalga del lado inferior del fondo de malla no permanezca sumergido en el medio líquido 22.

40 En realizaciones particularmente preferidas, la cantidad de medio líquido 22 proporcionada en la bolsa flexible 20, y la posición extendida del brazo de accionamiento 30 se eligen de manera que el fondo de malla 16 está separado por una distancia  $\Delta$  (Figura 1) de al menos 5 cm y preferiblemente 10 cm desde la superficie superior del medio líquido 22.

45 El funcionamiento del brazo de accionamiento 30 se controla por medio de un temporizador conectado a un motor de accionamiento 33 que está dispuesto para impulsar el movimiento del brazo de accionamiento 30 (Figura 3). El temporizador controla el movimiento, en uso, de la cámara de crecimiento 12 entre la primera y la segunda posición y, por lo tanto, controla la inmersión de material vegetal o de inóculo en el medio líquido 22. Mediante el ajuste apropiado del temporizador, es posible establecer períodos específicos de inmersión y ventilación según sea necesario para un material vegetal particular ubicado en los poros 18 del fondo de malla 16 de la cámara de crecimiento 12.

Un biorreactor 110 de acuerdo con una segunda realización de la invención se muestra en las Figuras 6 y 7.

## ES 2 714 083 T3

La estructura del biorreactor 110 es muy similar a la estructura del biorreactor 10 mostrado en las Figuras 1 y 2. Las características comunes a ambas realizaciones se refieren a la utilización de los mismos números de referencia y no se describirán de nuevo en detalle.

5 El biorreactor 110 mostrado en las Figuras 7 y 8 difiere del biorreactor 10 mostrado en las Figuras 1 y 2 en que omite un brazo de accionamiento 30 para impulsar el movimiento de la cámara de crecimiento 12 desde la primera posición a la segunda posición.

En la realización mostrada en las Figuras 7 y 8, la cámara de crecimiento 12 incluye un elemento de flotador 112 montado de manera que se extienda alrededor del fondo de malla 16 de la cámara de crecimiento 12.

10 El elemento de flotador 112 permite que la cámara de crecimiento 12 flote, en uso, en el medio líquido contenido en la bolsa flexible 20 y, con ello, ubique la cámara de crecimiento 12 en la segunda posición (Figura 7), en que la base de malla 16 está espaciada desde el fondo 28 de la cámara externa 24.

En la realización mostrada en las Figuras 7 y 8, el elemento de flotador 112 tiene una profundidad de 10 cm, de modo que, cuando la cámara de crecimiento 12 flota en el medio líquido 22, la malla de fondo 16 de la cámara de crecimiento 12 está separado por una distancia  $\Delta$  de 10 cm desde la superficie del medio líquido 22.

15 Con el fin de sumergir la cámara de crecimiento 12 en el medio líquido 22 cuando se requiera, el biorreactor 110 incluye cuatro émbolos 114 situados en la cámara externa 24. Los émbolos 114 están dispuestos de modo que los miembros de aplicación 116 previstos en los émbolos 114 se aplican en los bordes superiores de la cámara de crecimiento 12.

20 En uso, cada uno de los émbolos 114 es operativo para accionar selectivamente el miembro de acoplamiento 116 respectivo hacia abajo a lo largo del eje A desde una posición de reposo a una posición extendida con el fin de impulsar el movimiento de la cámara de crecimiento 12 desde la segunda posición a la primera posición en que el fondo de malla de la cámara de crecimiento 12 se sumerge en el medio líquido 22 (Figura 8).

25 Después de la inmersión del fondo de malla 16 de la cámara de crecimiento 12 en el medio líquido 22, cada uno de los émbolos 114 es operativo para accionar selectivamente el miembro de acoplamiento 116 respectivo hacia arriba a lo largo del eje A desde la posición extendida a la posición de reposo y guiando con ello el movimiento de la cámara de crecimiento 12 hacia arriba desde la primera posición hasta la segunda posición bajo la acción del miembro de flotador 112.

30 El funcionamiento de los émbolos 114 se controla por medio de un temporizador con el fin de controlar el movimiento, en uso, de la cámara de crecimiento 12 entre la primera y la segunda posiciones y, con ello, controlar la inmersión del material vegetal o del inóculo en el medio líquido 22. Mediante el ajuste apropiado del temporizador, es posible establecer períodos específicos de inmersión y ventilación según se requiera para un material vegetal particular ubicado en los poros 18 del fondo de malla 16 de la cámara de crecimiento 12

35 En un procedimiento particular de funcionamiento del biorreactor 10 mostrado en las Figuras 1 y 2 o el biorreactor 110 mostrado en las Figuras 7 y 8, el biorreactor 10, 110 está situado en un entorno controlado a 25°C, con un ciclo de 16 horas/8 horas día/noche y una intensidad de luz de  $50 \mu\text{Molm}^{-2}\text{s}^{-1}$  en el nivel de la bolsa.

El inóculo se introduce en la bolsa flexible 20 a través de la tercera lumbrera 42. Después de ello, 50 litros de medio líquido 22 se introducen en la bolsa flexible 20, de tal manera que el medio líquido 22 cubre el 80% de la cámara de crecimiento 12 cuando la cámara de crecimiento 12 se sumerge en el medio líquido 22 dentro de la bolsa flexible 20.

40 Partiendo del proceso de biorreactor con la cámara de crecimiento 12 en la segunda posición, separada de la parte inferior 28 de la cámara externa 24, el medio líquido 22 fluye a través del fondo de malla 16 de la cámara de crecimiento 12 para ser recogido en la parte inferior de la bolsa flexible 20 dentro de la cámara externa 24.

La bomba de aire está conectada a la primera lumbrera 38 para bombear aire ambiente en la bolsa flexible 20 a una velocidad de 15 litros por minuto durante un período de 10 minutos cada hora. En otras realizaciones, el aire puede estar enriquecido con hasta un 1% de dióxido de carbono.

45 El temporizador se establece para sumergir la cámara de crecimiento 12 en el medio líquido 22 durante un periodo de 4 minutos cada 6 horas.

Después de este modo de funcionamiento, el crecimiento de la biomasa se vuelve exponencial después de un período de retraso de 3 semanas (tal como se ilustra en la Figura 9) hasta que alcanza una meseta después de 50 días. El rendimiento máximo de biomasa se estima en alrededor de 300 g p. f./L (peso fresco por litro).

5 La biomasa de hoja de *Nicotiana tabacum* se muestra a modo de ejemplo ilustrativo de la biomasa 150 que puede producirse mediante el uso del biorreactor 10 de acuerdo con el método arriba descrito.

**REIVINDICACIONES**

- 1 Un biorreactor de inmersión temporal (10; 110) para la producción in vitro de biomasa vegetal diferenciada que comprende:
- 5 una cámara de crecimiento (12) que tiene una o más paredes laterales transparentes (14) y un fondo de malla (16), definiendo el fondo de malla una pluralidad de poros (18) para recibir material vegetal;
- una bolsa flexible (20) formada a partir de un material transparente, teniendo la bolsa flexible una abertura sellable y estando dimensionada para recibir la cámara de crecimiento junto con un medio líquido (22);
- 10 una cámara externa (24) que tiene una o más paredes laterales transparentes (26), estando formada la cámara externa para corresponder en forma a la cámara de crecimiento (12) y estando dimensionada para recibir la cámara de crecimiento dentro de la bolsa flexible de modo que el fondo de malla (16) de la cámara de crecimiento se enfrenta a un fondo (28) de la cámara externa que, en uso, está destinado a apoyarse en una superficie de soporte y el movimiento de la cámara de crecimiento dentro de la cámara externa está restringido al movimiento a lo largo de un solo eje, de manera que el fondo de malla (16) de la cámara de crecimiento se mueve hacia y desde el fondo (28) de la cámara externa; y
- 15 un mecanismo de accionamiento (30; 114) dispuesto para impulsar selectivamente el movimiento de la cámara de crecimiento (12) a lo largo de un solo eje, cuando la cámara de crecimiento y la bolsa flexible se reciben en la cámara externa, entre una primera posición en la que el fondo de malla de la cámara de crecimiento está ubicada en o hacia el fondo de la cámara externa y una segunda posición en la que el fondo de malla de la cámara de crecimiento está separado del fondo de la cámara externa.
- 20 2. Un biorreactor de inmersión temporal de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la bolsa flexible incluye, además, una lumbrera sellable para recibir medio líquido y/o inóculo a través de la misma.
3. Un biorreactor de inmersión temporal de acuerdo con la reivindicación 1, que incluye, además, una bomba de aire para la conexión a la bolsa flexible para permitir que un gas sea transportado a través de la bolsa flexible.
- 25 4. Un biorreactor de inmersión temporal de acuerdo con la reivindicación 3, en donde la bolsa flexible incluye al menos tres lumbreras, la primera y la segunda lumbrera están configuradas para la conexión a la bomba de aire para permitir el flujo de gas hacia dentro y hacia fuera de la bolsa flexible y una tercera lumbrera configurada para recibir medio líquido y/o inóculo a través de la misma.
- 30 5. Un biorreactor de inmersión temporal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el mecanismo de accionamiento incluye un brazo de accionamiento situado dentro de la cámara externa para aplicarse a una cara inferior del fondo de malla de la cámara de crecimiento, a través de la bolsa flexible, cuando la cámara de crecimiento y la bolsa flexible son recibidas en la cámara exterior, siendo el brazo impulsor móvil en una primera dirección a lo largo del eje único hacia arriba desde el fondo de la cámara externa hasta una posición extendida para impulsar la cámara de crecimiento desde la primera posición hasta la segunda posición, y siendo el brazo de accionamiento móvil desde la posición extendida en una segunda dirección opuesta a lo largo del eje único con el fin de guiar el movimiento de la cámara de crecimiento hacia abajo desde la segunda posición hasta la primera posición.
- 35 6. Un biorreactor de inmersión temporal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el mecanismo de accionamiento incluye un elemento de flotador montado con el fin de extenderse alrededor del fondo de malla de la cámara de crecimiento y permitir con ello que la cámara de crecimiento flote en un medio líquido contenido en la bolsa flexible cuando la cámara de crecimiento y la bolsa flexible son recibidas en la cámara externa y, con ello, ubican la cámara de crecimiento en la segunda posición, y el mecanismo de accionamiento incluye, además, uno o más elementos de accionamiento previstos en la cámara externa para aplicar selectivamente la cámara de crecimiento y el movimiento de la unidad de la cámara de crecimiento desde la segunda posición hasta la primera posición.
- 40 7. Un biorreactor de inmersión temporal de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el elemento de flotador tiene una profundidad de al menos 5 cm, de modo que, cuando la cámara de crecimiento flota en un medio líquido, el fondo de malla de la cámara de crecimiento está separado al menos 5 cm del medio líquido.
- 45 8. Un biorreactor de inmersión temporal de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el elemento de flotador tiene una profundidad de 10 cm.
- 50 9. Un biorreactor de inmersión temporal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el mecanismo de accionamiento incluye al menos dos electroimanes situados dentro de la cámara externa, hacia el

- fondo de la cámara externa, y al menos dos electroimanes situados en una superficie externa de la cámara de crecimiento, en la vecindad del fondo de malla de la cámara de crecimiento, siendo los electroimanes operativos de forma selectiva con el fin de crear campos magnéticos opuestos y, con ello, impulsar el movimiento de la cámara de crecimiento en una primera dirección a lo largo del eje único, desde la primera posición a la segunda posición, y el mecanismo de accionamiento incluye, además, uno o más elementos de accionamiento previstos en la cámara externa para aplicarse selectivamente a la cámara de crecimiento y el movimiento de la cámara de crecimiento en una segunda dirección opuesta a lo largo del eje único desde la segunda posición hasta la primera posición.
- 5
10. Un biorreactor de inmersión temporal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, en donde el mecanismo de accionamiento incluye uno o más elementos de accionamiento en forma de un émbolo situado dentro de la cámara externa, teniendo el o cada uno de los émbolos un miembro de acoplamiento para aplicarse a un borde superior de la o al menos una pared lateral de la cámara de crecimiento, a través de la bolsa flexible, cuando la cámara de crecimiento y la bolsa flexible son recibidas en la cámara externa, siendo el o cada uno de los émbolos móvil para impulsar el movimiento del miembro de acoplamiento respectivo desde una posición de reposo en la parte superior de la cámara externa, en la primera dirección hacia la posición extendida, y con ello impulsar el movimiento de la cámara de crecimiento desde la segunda posición hasta la primera posición, y siendo el o cada uno de los émbolos móviles para impulsar el movimiento del respectivo miembro de aplicación desde la posición extendida en una segunda dirección opuesta a lo largo del eje único con el fin de guiar el movimiento de la cámara de crecimiento desde la primera posición hasta la segunda posición bajo la acción del miembro de flotador o electroimanes opuestos.
- 10
- 15
- 20
11. Un biorreactor de inmersión temporal de acuerdo con la reivindicación 10, en donde el mecanismo de accionamiento incluye al menos tres émbolos de este tipo situados dentro de la cámara externa en ubicaciones separadas de manera equidistante alrededor de una circunferencia interior de la cámara externa.
- 25
12. Un biorreactor de inmersión temporal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en donde el mecanismo de accionamiento incluye al menos dos elementos de accionamiento en forma de al menos dos electroimanes situados dentro de la cámara externa, hacia el fondo de la cámara externa, y al menos dos electroimanes ubicados en la superficie exterior de la cámara de crecimiento, en la vecindad del fondo de malla de la cámara de crecimiento, siendo los electroimanes operativos de forma selectiva con el fin de crear campos magnéticos atrayentes y con ello impulsar el movimiento de la cámara de crecimiento en la segunda dirección a lo largo del eje único, desde la segunda posición hasta la primera posición.
- 30
13. Un biorreactor de inmersión temporal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el mecanismo de accionamiento incluye un temporizador para controlar el funcionamiento del mecanismo de accionamiento y, con ello, en uso, controlar el movimiento de la cámara de crecimiento entre las posiciones primera y segunda.
- 35
14. Un biorreactor de inmersión temporal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la bolsa flexible está formada a partir de un polímero termoplástico flexible.
15. Un biorreactor de inmersión temporal de acuerdo con la reivindicación 14, en donde la bolsa flexible está formada a partir de polipropileno, polietileno o poliuretano.
- 40
16. Un biorreactor de inmersión temporal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde las formas en sección transversal de la cámara de crecimiento y la cámara externa, en un plano generalmente perpendicular al eje único, son las mismas, seleccionándose la forma en sección transversal de circular, elíptica, cuadrada, triangular o rectangular.
- 45
17. Un biorreactor de inmersión temporal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el fondo de malla de la cámara de crecimiento se forma para definir poros que tienen un tamaño en el intervalo de 50-500  $\mu\text{m}$ .
18. Un biorreactor de inmersión temporal de acuerdo con la reivindicación 17, en donde el fondo de malla de la cámara de crecimiento se forma para definir poros que tienen un tamaño en el intervalo de 100-200  $\mu\text{m}$ .
- 50
19. Un biorreactor de inmersión temporal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la cámara de crecimiento incluye una sección de malla situada en la o en una pared lateral, en o hacia un borde opuesto desde el fondo de malla, el fondo de malla y la sección de malla se forman a partir del mismo material y tienen el mismo tamaño de poros que el fondo de malla de la cámara de crecimiento.

20. Un biorreactor de inmersión temporal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la cámara de crecimiento está formada para definir un volumen interno en el intervalo de 10-1.000 litros.

21. Un biorreactor de inmersión temporal de acuerdo con la reivindicación 20, en donde la cámara de crecimiento está formada para definir un volumen interno en el intervalo de 30 a 150 litros.

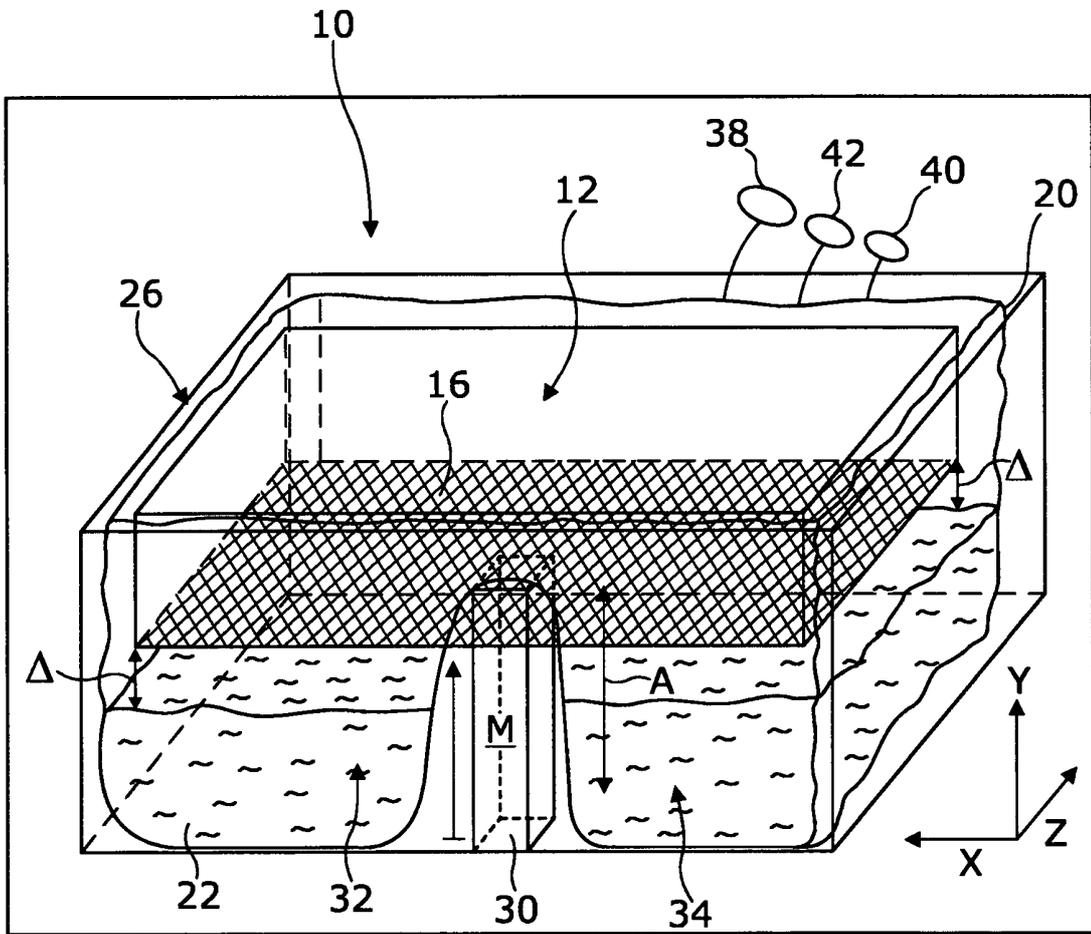


Figura 1

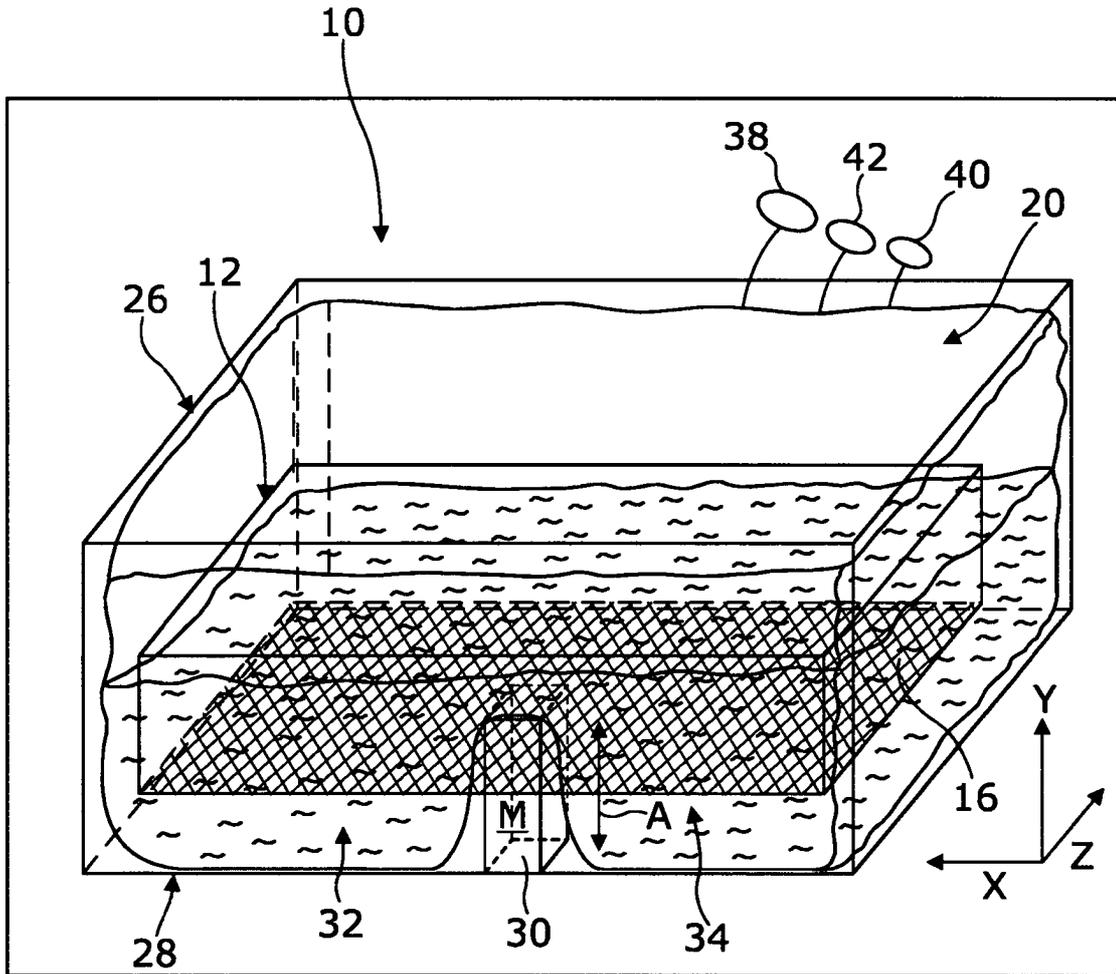


Figura 2

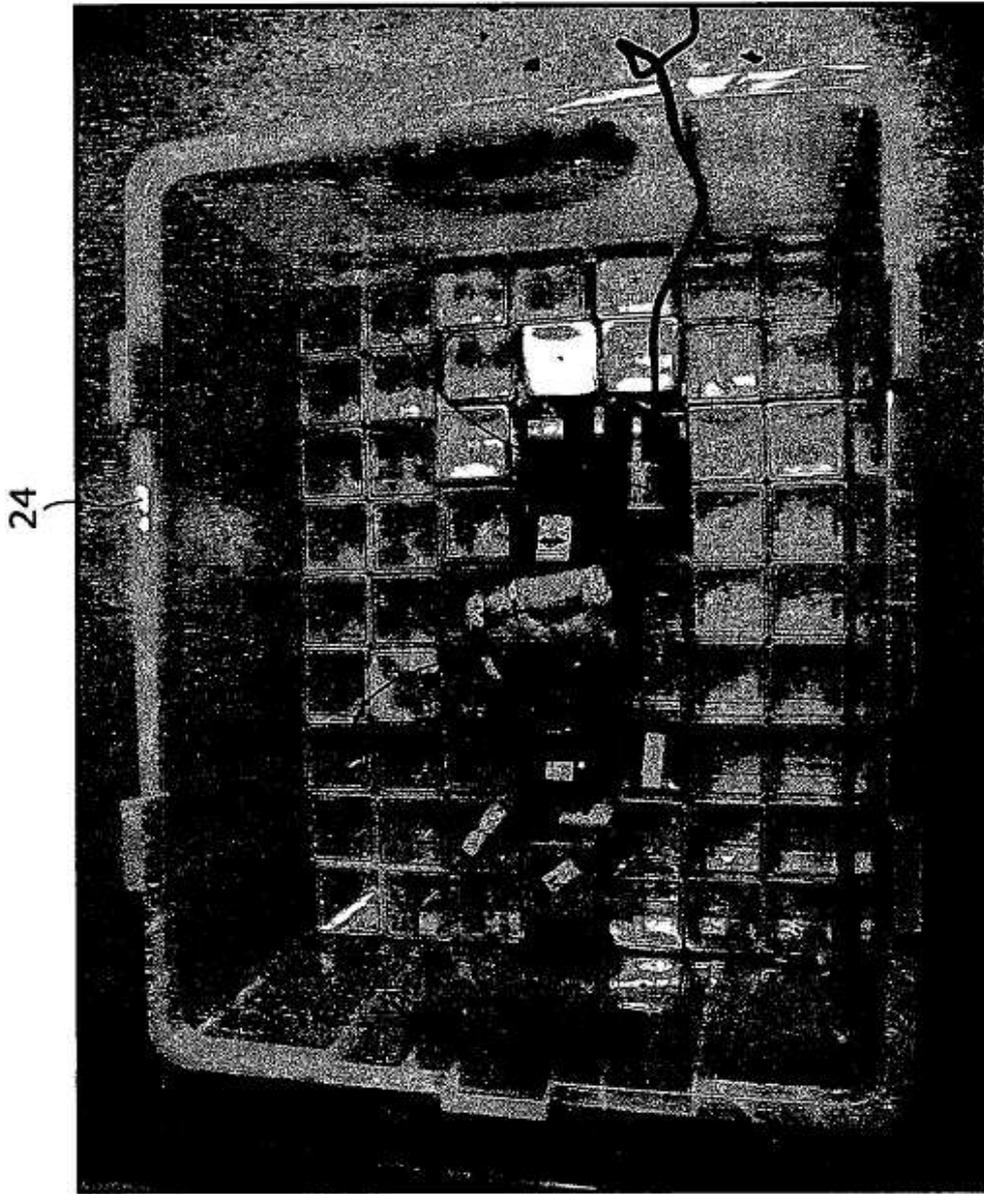


Figura 3

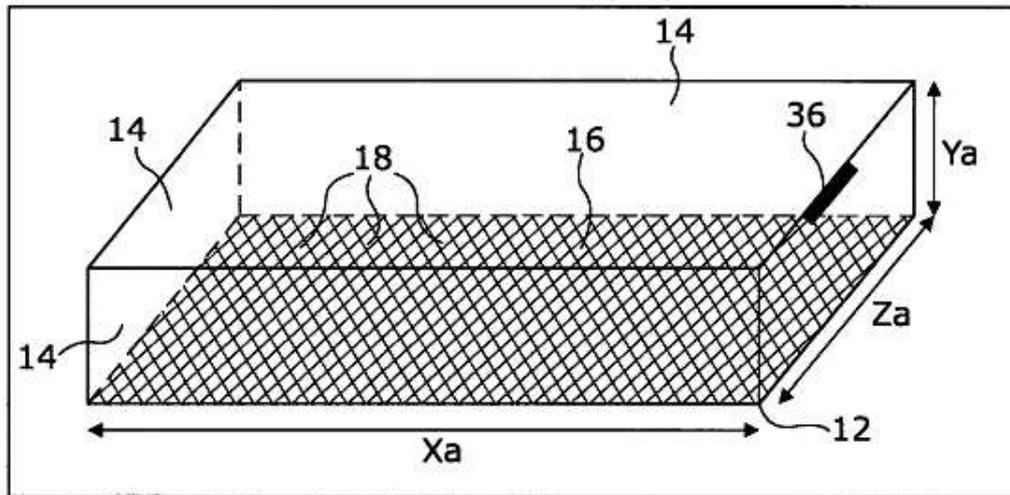


Figura 4a

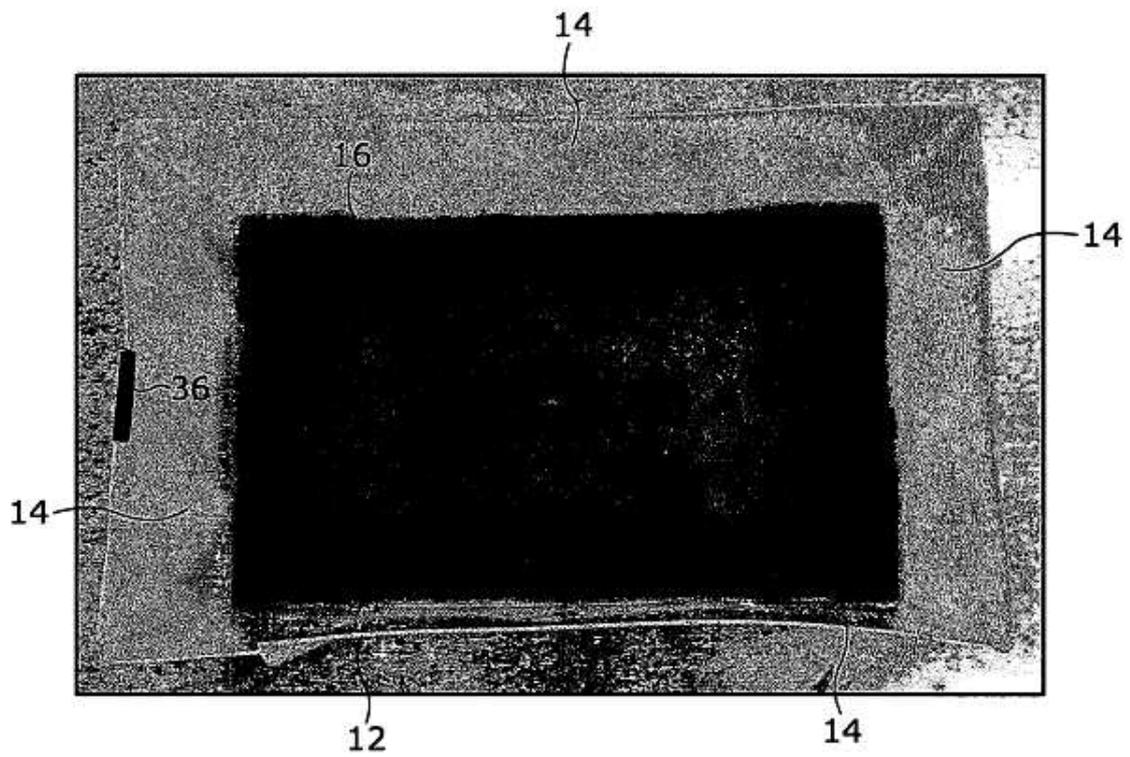


Figura 4b

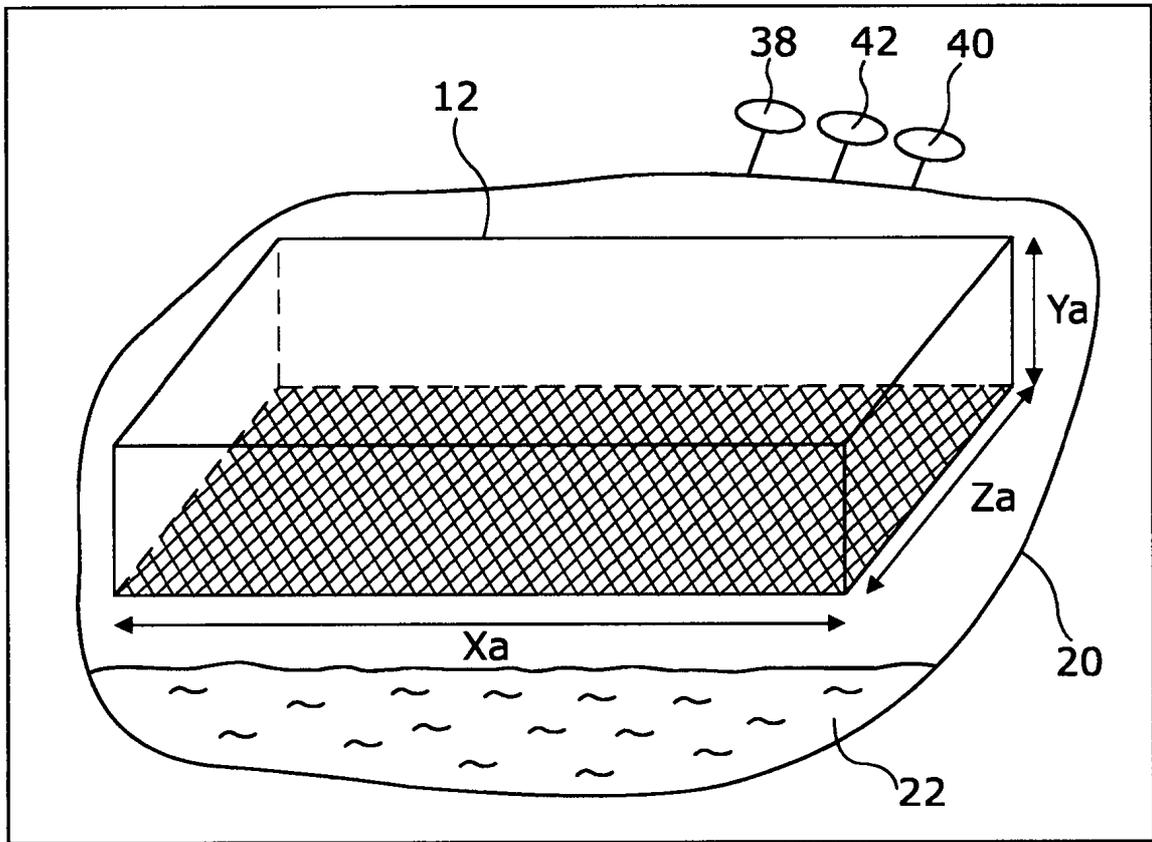


Figura 5a



Figura 5b

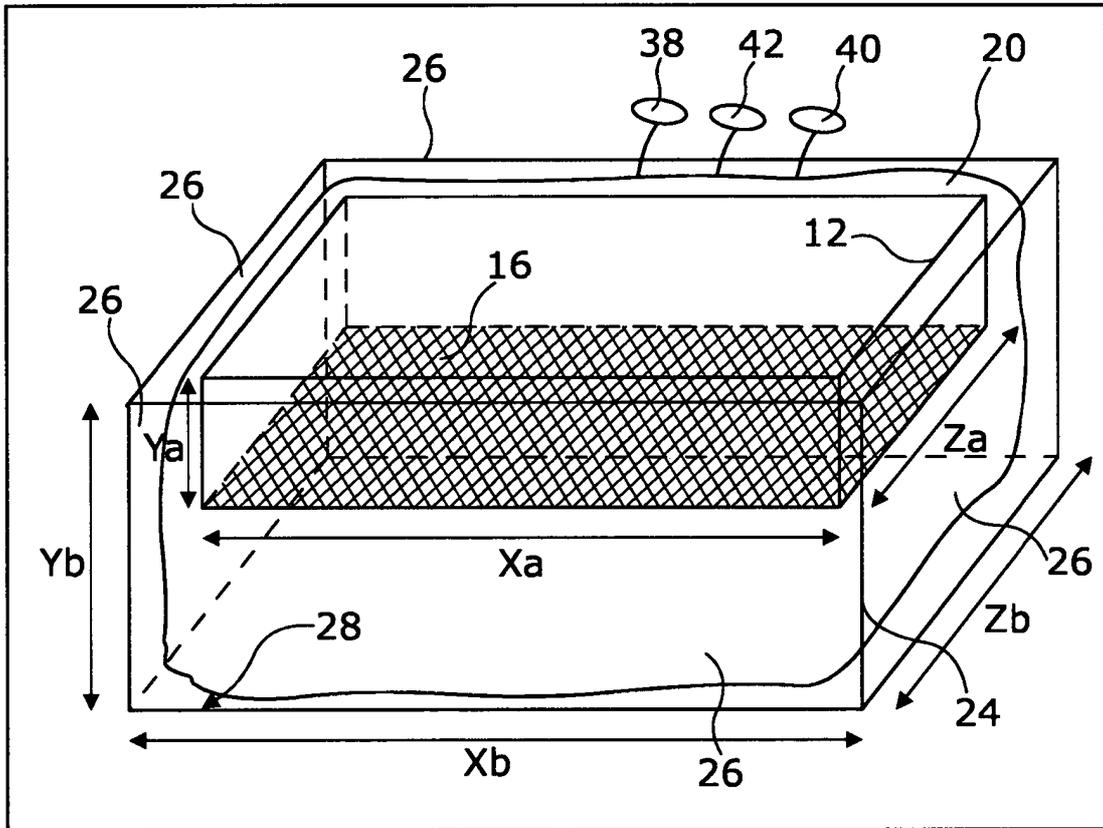


Figura 6a

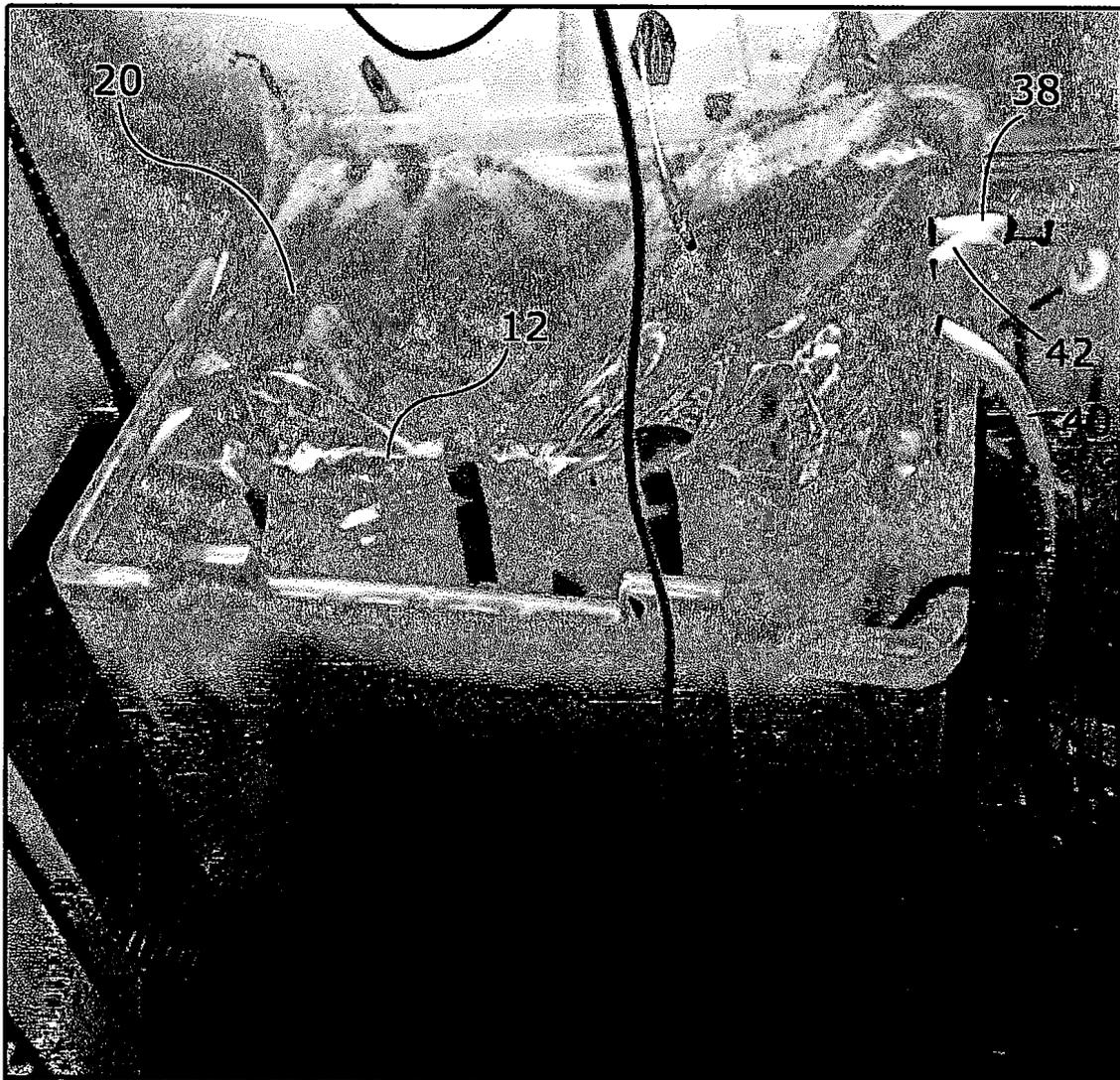


Figura 6b

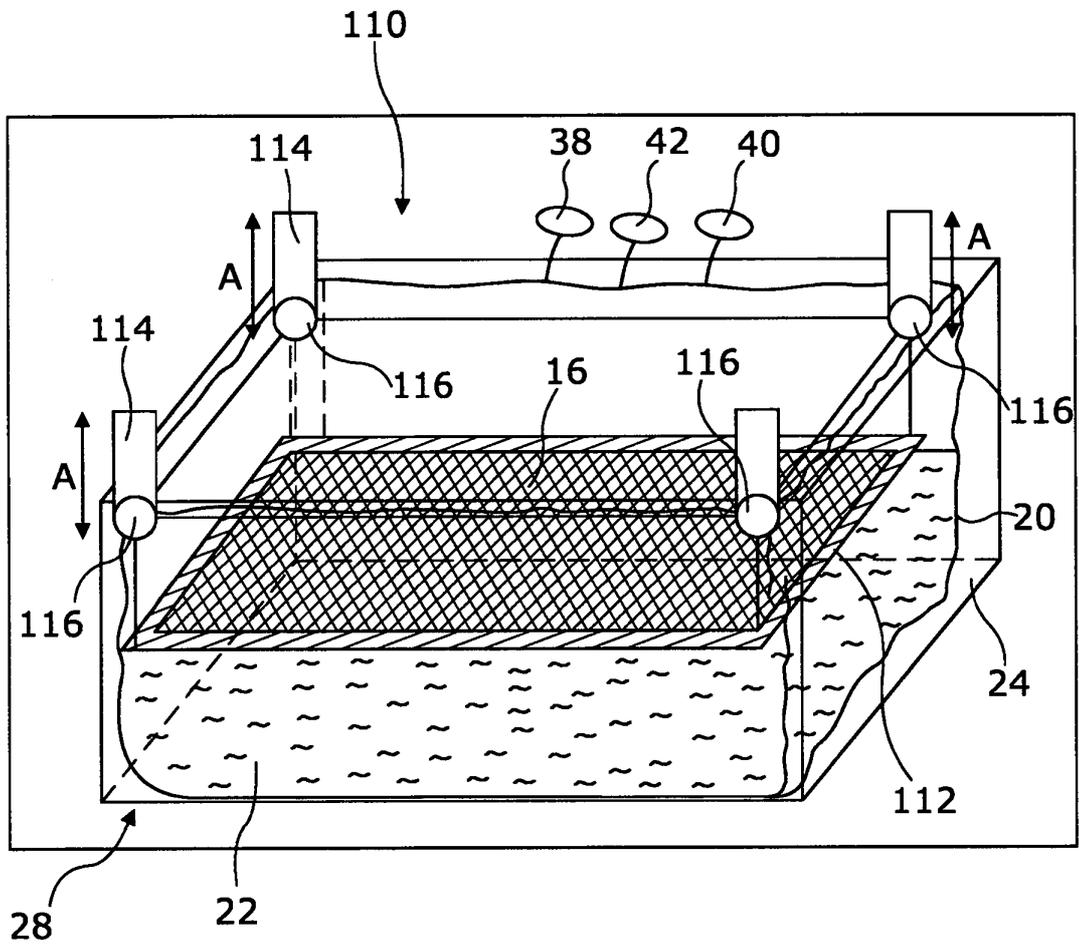


Figura 7

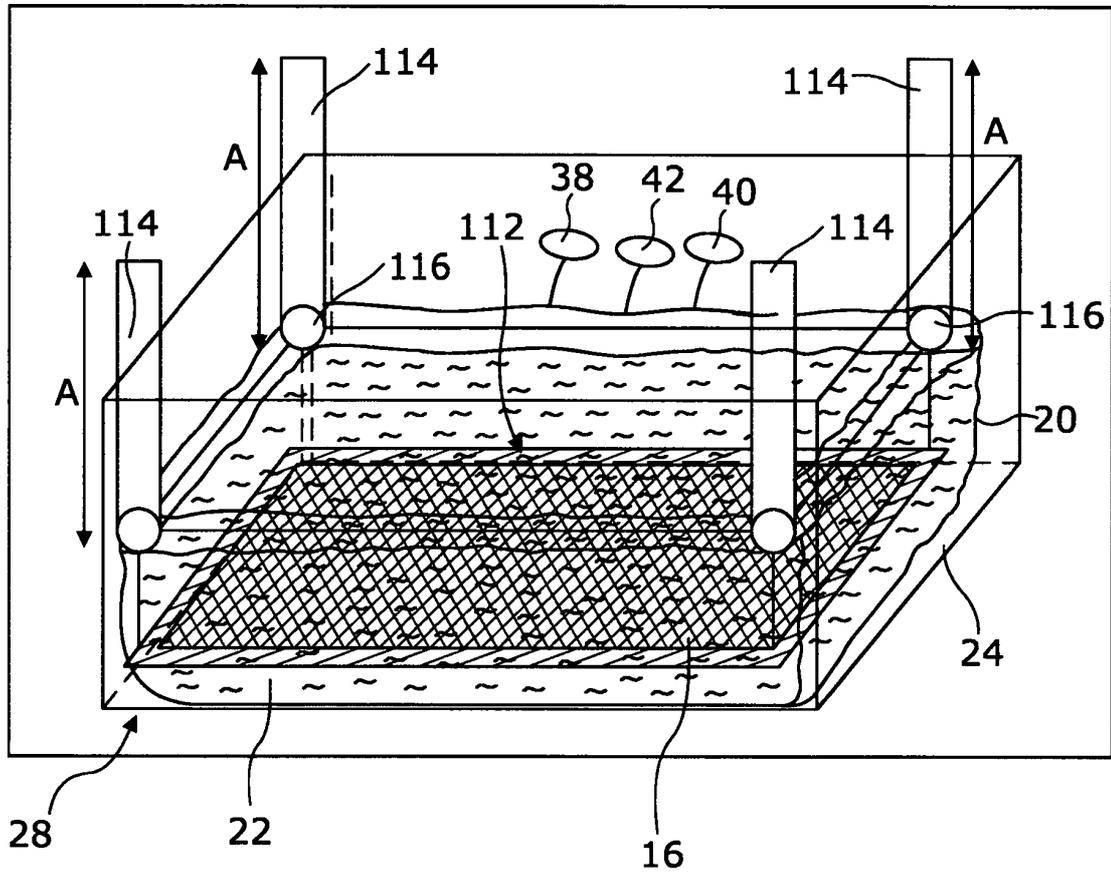


Figura 8

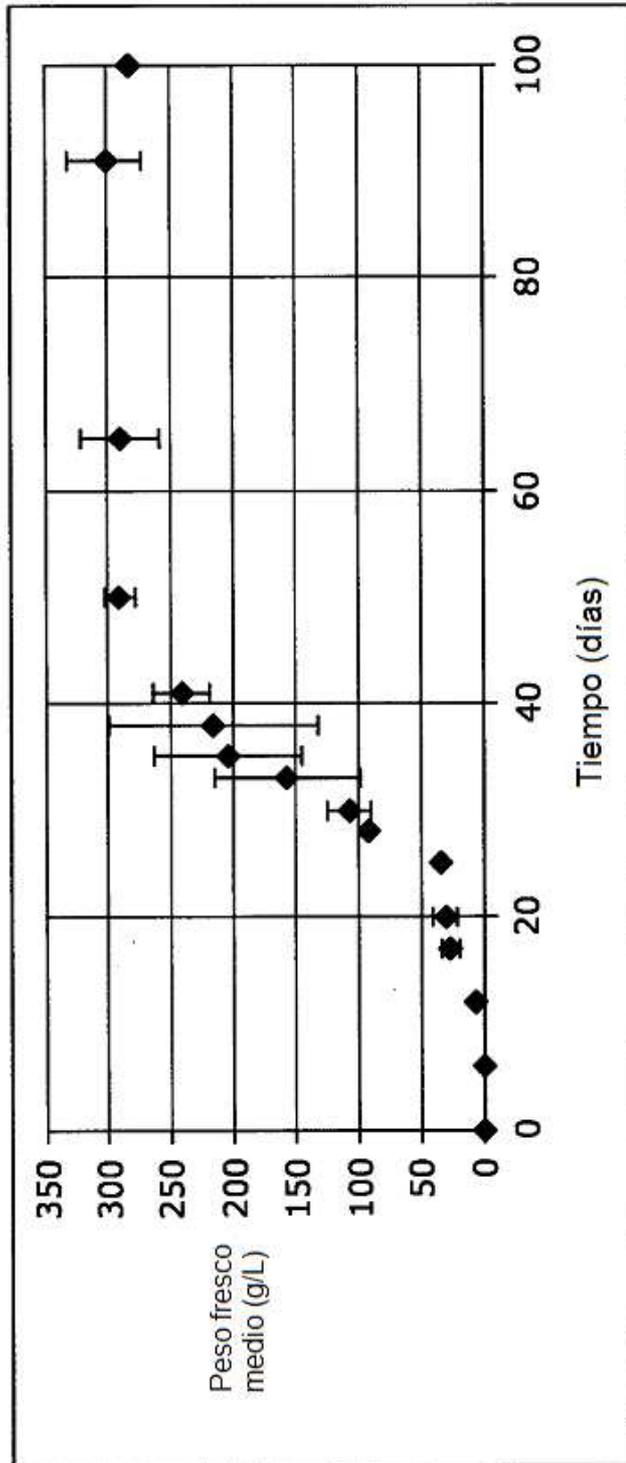


Figura 9

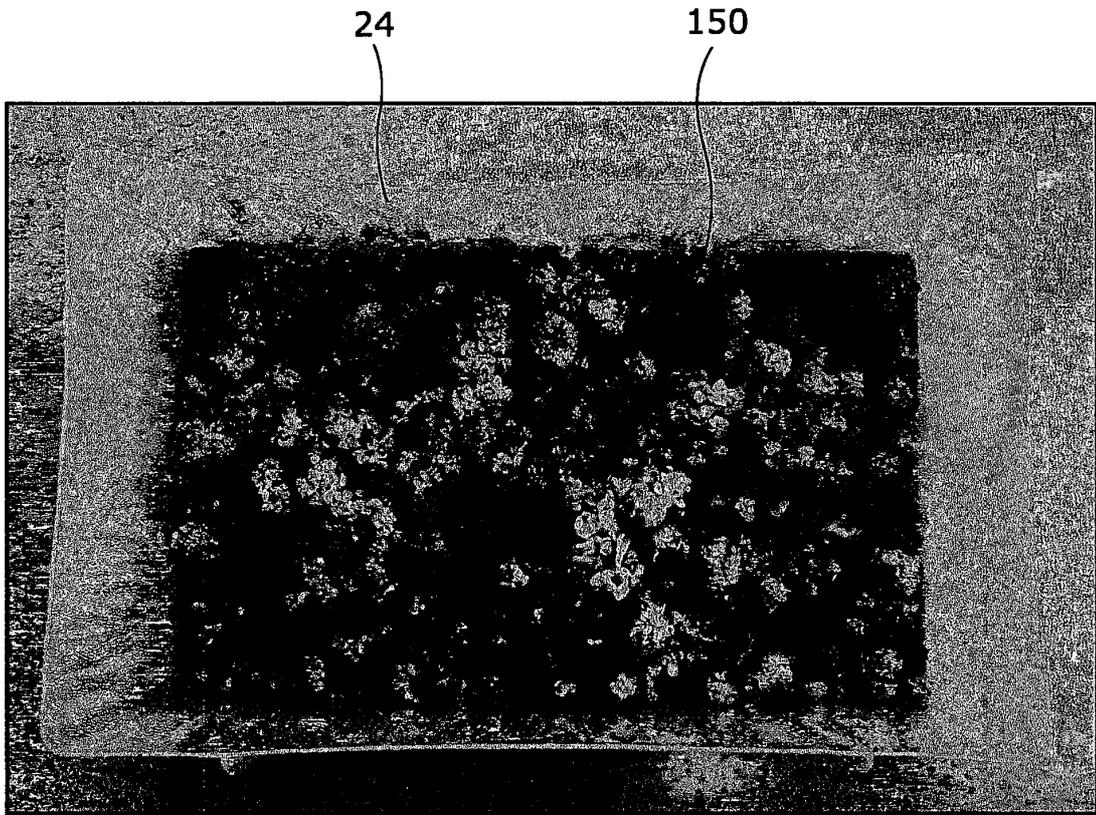


Figura 10