

TÍTULO DE PATENTE NO. 323946

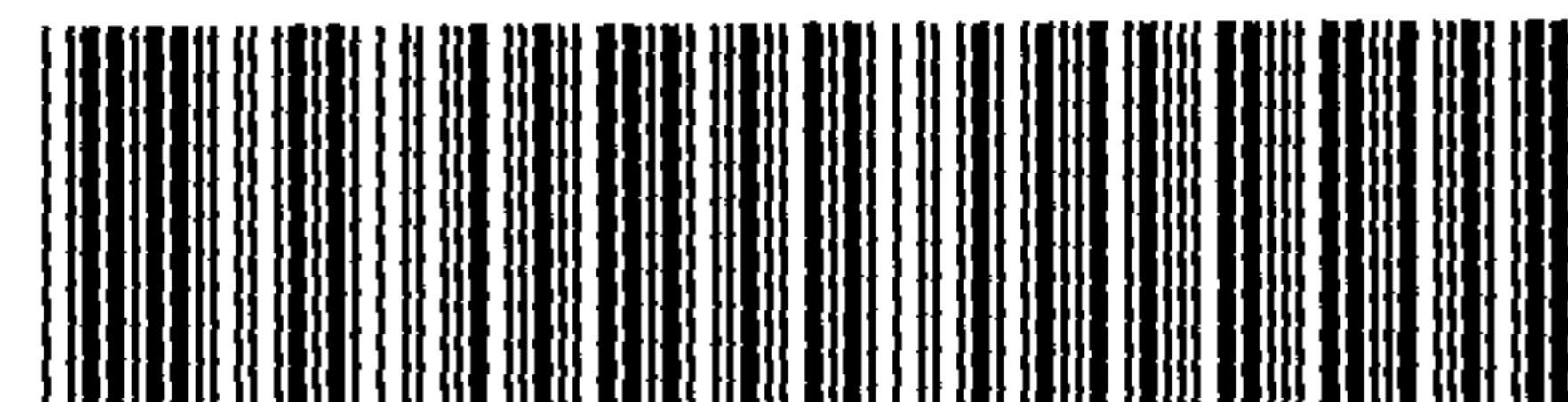
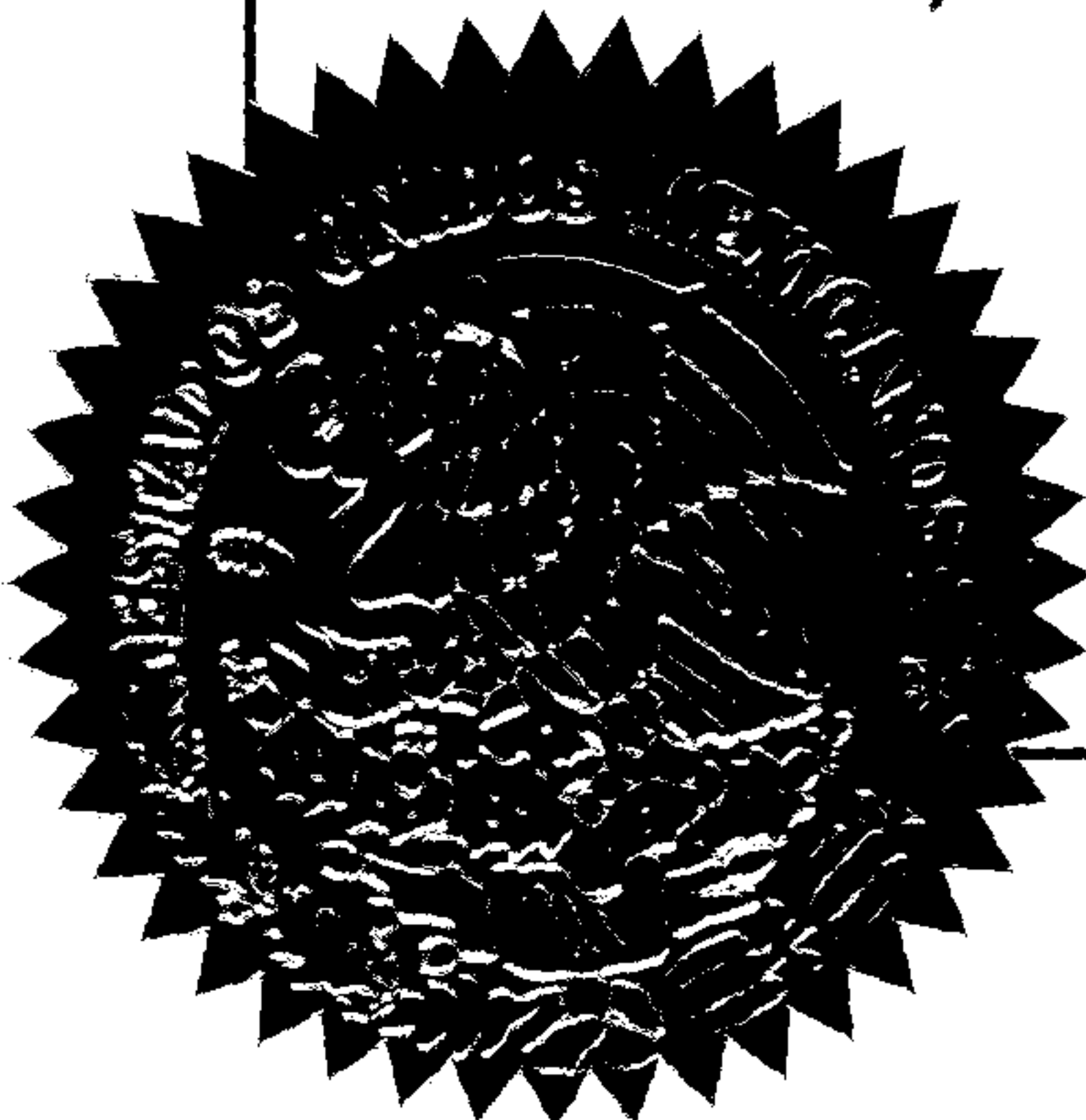
Titular(es): CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN A.C.
Domicilio: Calle 43 # 130, Col. Chuburná de Hidalgo, 97200, Mérida, Yucatán, MÉXICO
Denominación: BIORREACTOR Y MÉTODO PARA EL CULTIVO *IN VITRO* DE MATERIAL BIOLÓGICO POR INMERSIÓN TEMPORAL.
Clasificación: Int.CI.8: C12M3/00
Inventor(es): MANUEL LUIS ROBERT DIAZ; LEONARDO GUS PELTINOVICH; JOSÉ LUIS HERRERA HERRERA; GASTÓN ALEJANDRO HERRERA HERRERA; MIGUEL ANGEL HERRERA ALAMILLO

SOLICITUD		
Número: MX/a/2009/008318	Fecha de presentación: 4 de agosto de 2009	Hora: 15:36
PRIORIDAD		
País:	Fecha:	Número:
Vigencia: Veinte años		
Fecha de Vencimiento: 4 de agosto de 2029		
<p>La patente de referencia se otorga con fundamento en los artículos 1º, 2º fracción V, 6º fracción III, y 59 de la Ley de la Propiedad Industrial.</p> <p>De conformidad con el artículo 23 de la Ley de la Propiedad Industrial, la presente patente tiene una vigencia de veinte años improrrogables, contada a partir de la fecha de presentación de la solicitud y estará sujeta al pago de la tarifa para mantener vigentes los derechos.</p> <p>Quien suscribe el presente título lo hace con fundamento en lo dispuesto por los artículos 6º fracciones III y 7º bis 2 de la Ley de la Propiedad Industrial (Diario Oficial de la Federación (D.O.F.) 27/06/1991, reformada el 02/08/1994, 25/10/1996, 26/12/1997, 17/05/1999, 26/01/2004, 16/06/2005, 25/01/2006, 06/05/2009, 06/01/2010, 18/06/2010, 28/06/2010, 27/01/2012 y 09/04/2012); artículos 1º, 3º fracción V inciso a), sub inciso iii) 4º y 12º fracciones I y III del Reglamento del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (D.O.F. 14/12/1999, reformado el 01/07/2002, 15/07/2004, 28/07/2004 y 7/09/2007); artículos 1º, 3º, 4º, 5º fracción V inciso a), sub inciso iii), 16 fracciones I y III y 30 del Estatuto Orgánico del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (D.O.F. 27/12/1999, reformado el 10/10/2002, 29/07/2004, 04/08/2004 y 13/09/2007); 1º, 3º y 5º inciso a) y antepenúltimo párrafo del Acuerdo que delega facultades en los Directores Generales Adjuntos, Coordinador, Directores Divisionales, Titulares de las Oficinas Regionales, Subdirectores Divisionales, Coordinadores Departamentales y otros subalternos del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial. (D.O.F. 15/12/1999, reformado el 04/02/2000, 29/07/2004, 04/08/2004 y 13/09/2007).</p>		

Fecha de expedición: 19 de agosto de 2014

SUBDIRECTOR DIVISIONAL DE EXAMEN DE FONDO DE PATENTES, ÁREAS MECÁNICA, ELÉCTRICA Y DE REGISTROS DE DISEÑOS INDUSTRIALES Y MODELOS DE UTILIDAD

PEDRO DAVID FRAGOSO LÓPEZ

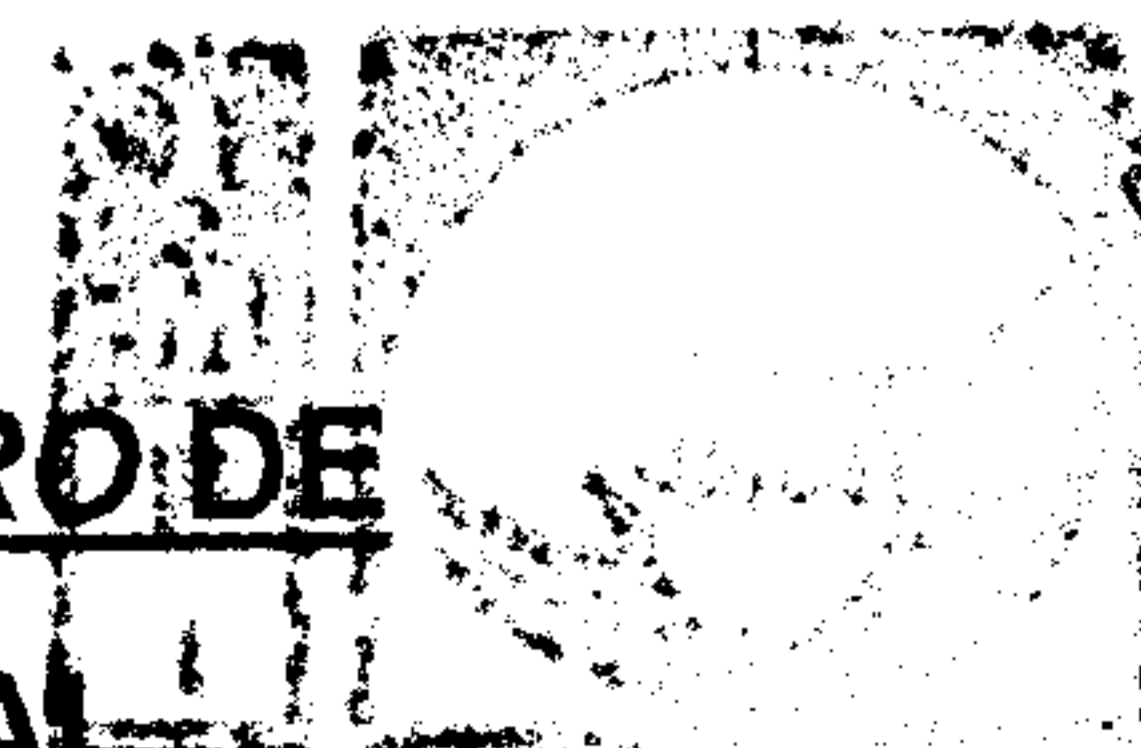


323946

19/8/14

2009/83/8

BIORREACTOR Y MÉTODO PARA EL CULTIVO *IN VITRO* DE MATERIAL BIOLÓGICO POR INMERSIÓN TEMPORAL



Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial

5 **ANTECEDENTES**

1. Campo Técnico de la Invención

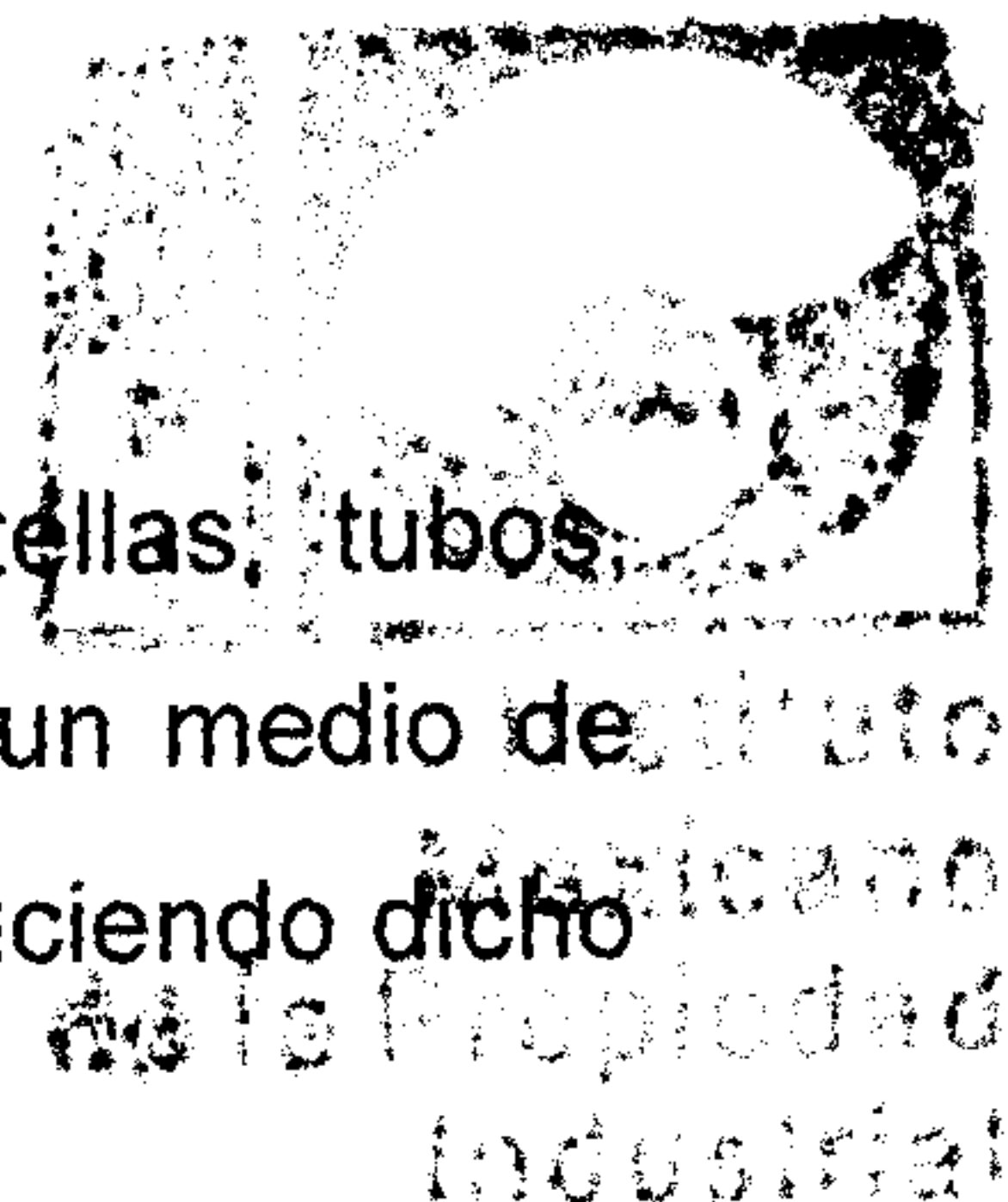
10 La presente invención se refiere a un biorreactor para el cultivo *in vitro* de material biológico, preferentemente material vegetal de cualquier especie como células, tejidos, órganos, embriones vegetales o plántulas, obtenido de explantes extraídos de plantas madres, en un medio de cultivo líquido y ambiente gaseoso, y un método de cultivo por inmersión temporal que permite la inducción, el crecimiento, la multiplicación y enraizamiento de diferentes especies vegetales.

15

2. Antecedentes generales de la invención.

20 El proceso de micropropagación *in vitro* es bien conocido en la técnica previa. Éste generalmente incluye las siguientes fases de cultivo: (a) la inducción de la formación de plántulas a partir de explantes de tejidos de plantas; (b) la multiplicación para producir un gran número de plántulas de un mismo genotipo; su crecimiento para alcanzar un tamaño adecuado; y (c) su maduración y enraizamiento para sobrevivir a las condiciones de transplante a la tierra. El proceso de micropropagación *in vitro* requiere que las plántulas se mantengan en un medio de cultivo nutritivo dentro de un ambiente gaseoso y bajo iluminación específica según la especie vegetal, el tipo de tejido cultivado y el grado de multiplicación o crecimiento deseado.

30 La inmersión temporal es empleada para el cultivo *in vitro* y consiste en someter, en un biorreactor, a las plántulas o a sus tejidos a periodos alternados de inmersión en un medio de cultivo líquido, y de aireación. Los biorreactores que



proveen estas características comprenden contenedores como botellas, tubos, frascos, platos, recipientes o compartimentos de diversas formas y un medio de cultivo líquido, que fluye generalmente de un contenedor a otro, produciendo dicho flujo periodos alternados de inmersión y aireación.

5

Los biorreactores de la técnica previa tienen diferentes inconvenientes. Por ejemplo el sistema *Rita*TM [Etienne y Berthouly en *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69, 2(2002)] involucra un biorreactor con dos contenedores superpuestos, las plántulas son colocadas en el contenedor superior y el medio de cultivo líquido se ubica en el contenedor inferior. Durante la operación se alimenta aire fresco para producir el desplazamiento del medio de cultivo líquido del contenedor inferior hacia el contenedor superior, el cual posteriormente cae por la acción de la gravedad al retirar la presión. Este sistema tiene la desventaja de ser de tamaño pequeño, generar burbujas en el medio de cultivo líquido, y presentar un gradiente de humedad de la parte baja a la parte alta del contenedor de plántulas. Es, además, muy costoso y tiene muchas piezas y conexiones externas lo que lo encarece y dificulta su mantenimiento.

Existe también un sistema que emplea dos contenedores separados: uno de ellos contiene las plántulas y el otro el medio de cultivo líquido, el cual es bombeado de un contenedor a otro [Espinosa en *Inform. Syst. Biotechn. New Reports*, 2, 7 (2002)]; este sistema tiene la desventaja de ser voluminoso y, por tanto, de difícil manipulación.

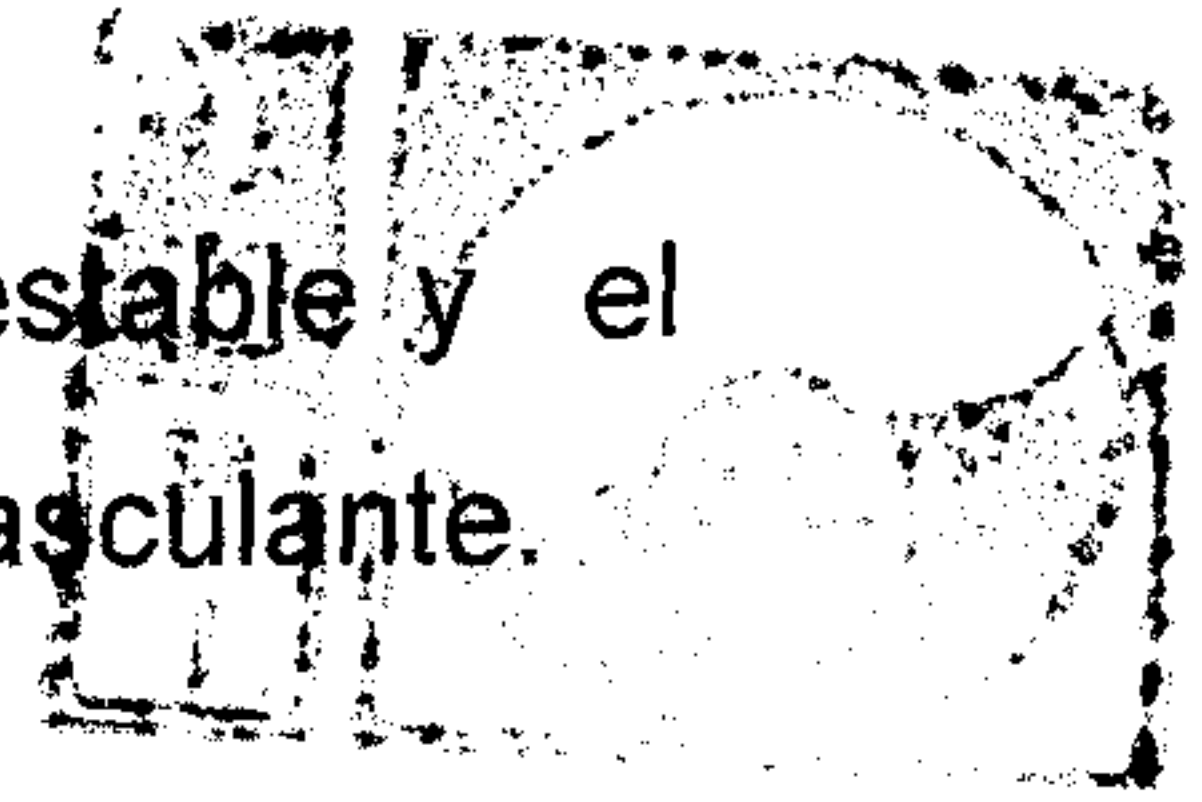
También existen sistemas rotatorios en los que las plántulas son colocadas (y sujetas) en compartimentos periféricos interiores de un contenedor cilíndrico, el cual al girar sumerge las plántulas en el medio de cultivo líquido dispuesto en el interior del contenedor cilíndrico [Tanaka, *et. al, Biotechnology Bioenergy* (1983)]. Estos sistemas tienen la desventaja de ser pequeños. Además, es difícil controlar la entrada y salida de aire en el biorreactor.

Existen otros sistemas que emplean contenedores colocados en sistemas con movimiento de balanceo, donde la simple acción de la gravedad produce un movimiento del medio de cultivo líquido, tal y como es expuesto en las patentes norteamericanas de Singh. En la patente US-6,190,913, Singh describe un biorreactor que consiste de una bolsa plástica flexible y preesterilizada, que contiene células en el medio de cultivo líquido, el cual es colocado sobre un sistema que produce un movimiento de balanceo de hasta treinta veces por minuto. Este equipo fue mejorado por el mismo autor en la patente norteamericana No. 6,544,788, incluyendo un filtro flotante y móvil sobre la superficie del medio que aumentó el rendimiento del cultivo de células en este medio de cultivo líquido. En ambos equipos, el principal objetivo de esta técnica es producir olas en el medio de cultivo líquido para mantener en suspensión a las células y al medio de cultivo líquido bien mezclado, a bajas velocidades de corte y sin originar burbujas. Cada bolsa es puesta en un equipo de balanceo individual, lo que hace que sus costos de operación sean elevados.

Por su parte, las patentes norteamericanas No. 6,566,126 y 6,933,144 de Cadwell, se refieren a un biorreactor que opera bajo un principio de oscilación. Cadwell describe un contenedor de tres secciones, en el que las células son alojadas en la sección central que contiene una serie de fibras capilares, huecas y semipermeables; dos secciones laterales que sirven para contener y pasar el medio de cultivo líquido de un lado al otro a través del medio filtrante, mediante el movimiento de balanceo. Este biorreactor tiene como desventaja el elevado precio del equipo de balanceo, que es proporcional al volumen de las bolsas o contenedores. Este biorreactor tiene la desventaja adicional de que no produce inmersión temporal, por lo que no es adecuado para el cultivo de plántulas, ya que ocasionaría la vitrificación de sus tejidos.

La patente mexicana No. 263386 describe un biorreactor cilíndrico formado por dos cámaras unidas por un conector. Dicho conector puede provocar fugas del

medio de cultivo líquido. Por su forma cilíndrica, el biorreactor es inestable y el cultivo está sujeto a golpeteo y maltrato por los ciclos de movimiento basculante.



Además, todos los biorreactores de la técnica previa arriba mencionados no disponen de un medio para prevenir la degradación del medio de cultivo líquido por la acción de la luz.

Instituto
de
Investigaciones
Industriales

RESUMEN DE LA INVENCION

10

Un objeto de la invención consiste en proporcionar un sistema para el cultivo *in vitro* de material biológico, preferentemente material vegetal de cualquier especie como células, tejidos, órganos, embriones ó plántulas, integrado por al menos un biorreactor acoplado a un equipo de balanceo que le proporciona un movimiento de vaivén, que permita cultivar *in vitro* material biológico por inmersión temporal.

15

Otro objeto de la invención consiste en proporcionar un biorreactor apilable, autónomo, transportable, de capacidad variable, y de fácil manejo.

20

Otro objeto de la invención consiste en proporcionar un biorreactor adecuado para operar bajo ciclos de inmersión y aireación de plántulas, sin someterlas a un movimiento excesivo para prevenir su daño.

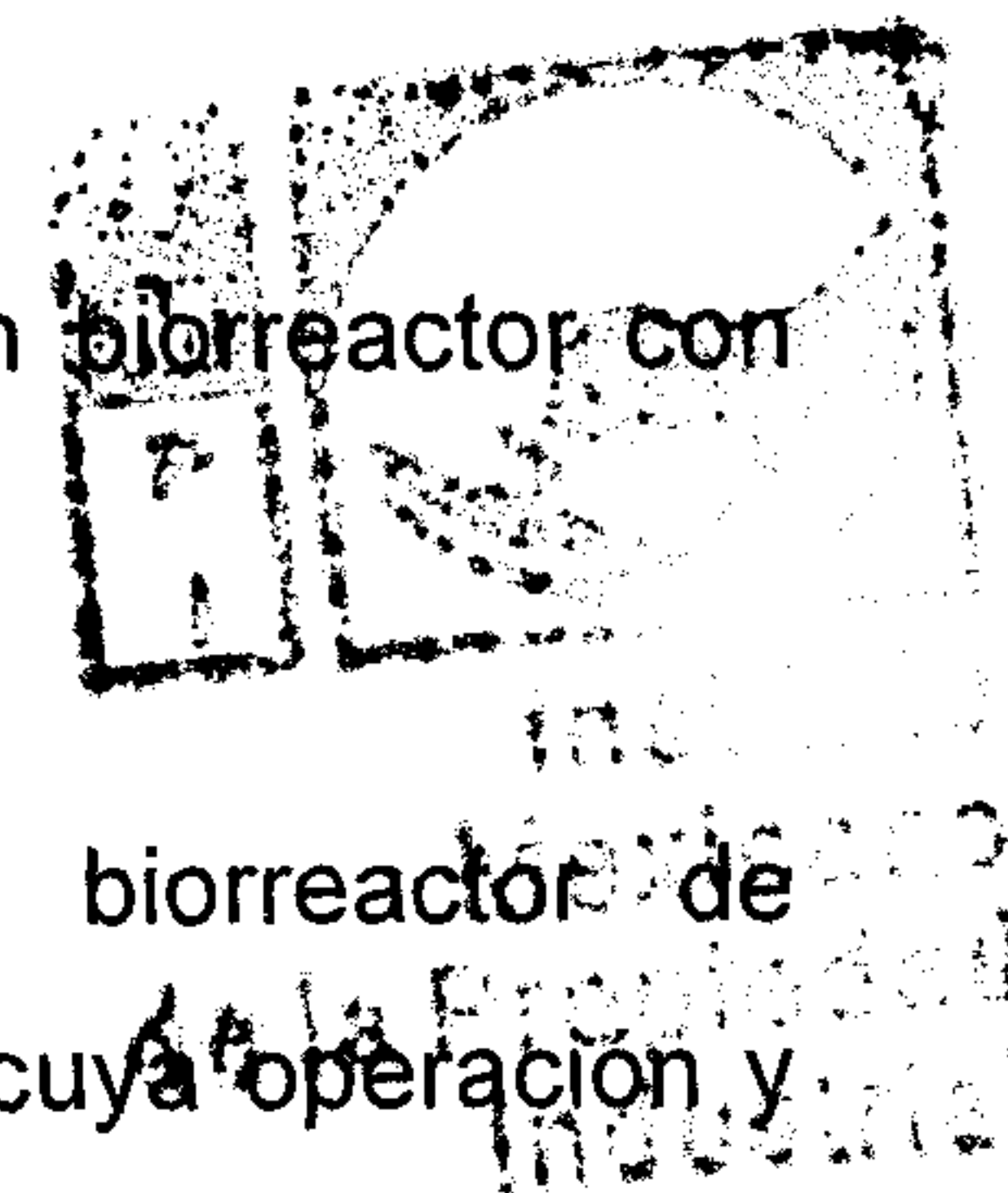
25

Aún otro objeto de la invención consiste en proporcionar un biorreactor para cultivar plántulas que prevenga o retarde la degradación del medio de cultivo líquido por la acción de la radiación ultravioleta (UV) de la luz.

30

Otro objeto de la invención consiste en proporcionar un biorreactor que reduce la formación de espuma del medio de cultivo líquido.

Todavía otro objeto de la invención consiste en proporcionar un biorreactor con intercambio gaseoso mejorado.



Otro objeto de la invención consiste en proporcionar un biorreactor de construcción simple con un mínimo de mangueras y accesorios cuya operación y mantenimiento se pueda realizar fácilmente.

Aún otro objeto de la invención es proporcionar un biorreactor de bajo costo de adquisición, operación y mantenimiento, que contribuya a reducir los costos de la técnica de micropropagación.

Otro objeto de la invención consiste en proporcionar un biorreactor con un cierre hermético que previene el derramamiento de medio de cultivo líquido durante su operación.

Otro objeto de la invención consiste en proporcionar un biorreactor que opera con un nivel reducido de medio de cultivo.

Otro objeto de la invención consiste en proporcionar un biorreactor equipado con compartimentos para el cultivo de material vegetal, para facilitar su manejo y preservar su integridad.

Otro objeto de la invención consiste en proporcionar un biorreactor con un medio para la protección de las raíces de la acción de la luz.

Los anteriores objetos se consiguen por medio de proporcionar un biorreactor que comprende dos secciones situadas dentro de un recinto común transparente, cubiertos por una tapa común, transparente, provista de doble borde de cierre y de puertos para permitir el intercambio gaseoso con el ambiente y la extracción o introducción de fluidos líquidos o gaseosos. Una de las cámaras está destinada a albergar el cultivo y puede dividirse en sub-cámaras. Cada sub-cámara puede, a

su vez, recibir contenedores compartimentados para alojar ejemplares de pequeño tamaño. La otra cámara aloja un contenedor opaco cuya función es la de proteger de la luz al medio de cultivo durante los periodos de no inmersión o no irrigación (aeración) y, al mismo tiempo, impedir el paso del material vegetativo. Una base opaca colocada debajo del biorreactor complementa el bloqueo del paso de la luz hacia el medio de cultivo contenido en su respectiva cámara, y lo extiende a la cámara de cultivo para reducir sus efectos sobre las raíces de las plantas. El biorreactor deberá estar acoplado a un equipo de balanceo que cumpla con los siguientes requerimientos: ser capaz de producir un movimiento basculante, continuo o discontinuo, cíclico y de periodos programables.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Las siguientes figuras ilustran una realización de la presente invención, incorporan parte de las especificaciones y, junto con la descripción, sirven para explicar sus principios de operación.

La Fig. 1 ilustra un biorreactor conforme a la presente invención.

La Fig. 2 muestra la cubierta del biorreactor y un detalle de su construcción.

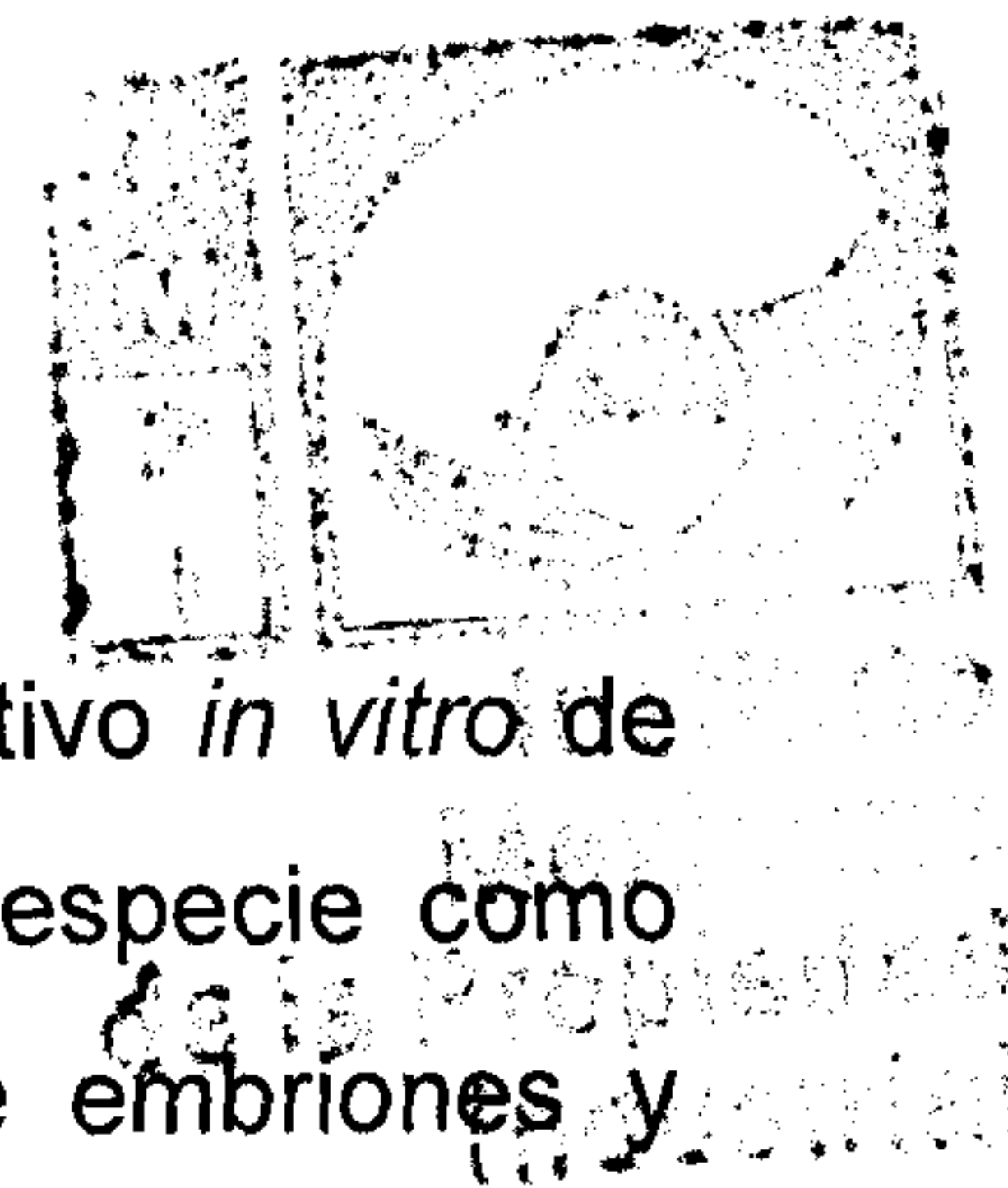
La Fig. 3 ilustra el biorreactor en una vista explotada.

La Fig. 4. ilustra un equipo de balanceo asociado al biorreactor.

La Fig. 5 ilustra el movimiento basculante del biorreactor.

30

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION



La presente invención está relacionada con un sistema para el cultivo *in vitro* de material biológico, preferentemente material vegetal de cualquier especie como células, tejidos, órganos, embriones o plántulas, preferentemente embriones y plántulas.

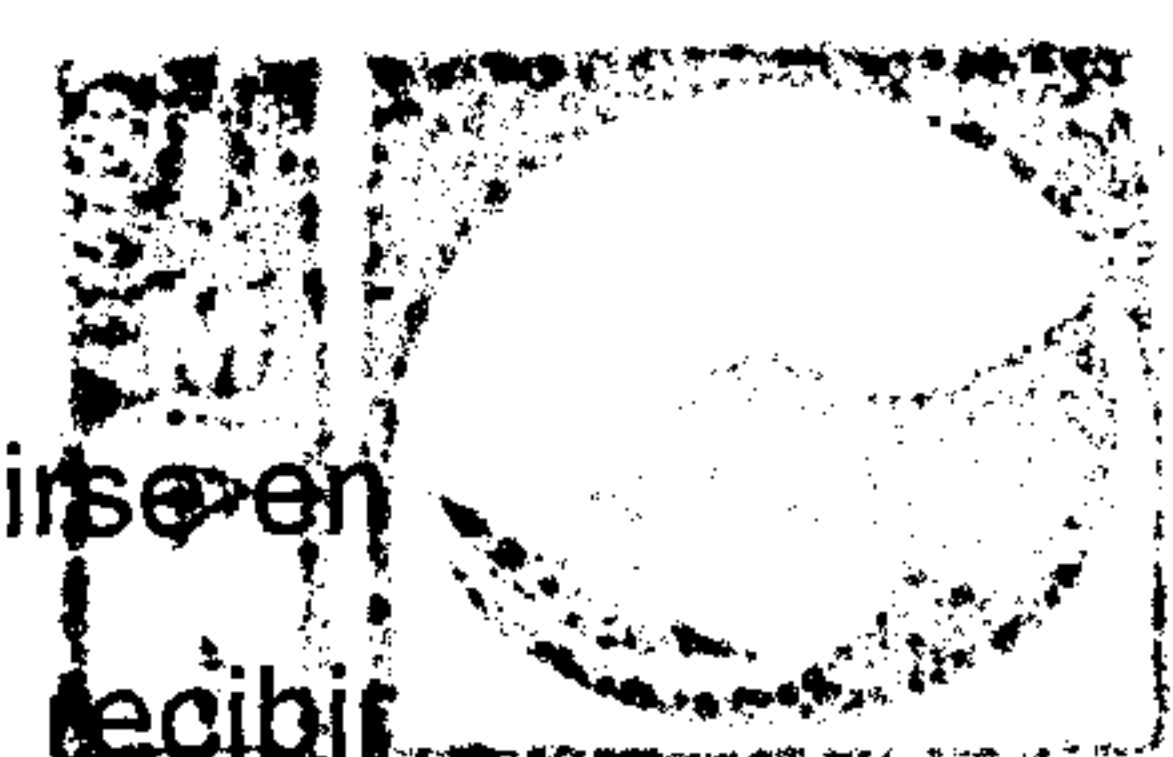
La descripción se realiza con referencia a las figuras. El sistema está integrado por al menos un biorreactor (10) -Fig. 1- incorporado a un equipo de balanceo (80) - Fig. 4- que proporciona al biorreactor (10) un movimiento basculante en torno de un eje. El movimiento basculante producido por el equipo de balanceo (80) permite cultivar *in vitro* material biológico por inmersión temporal.

BIORREACTOR

El biorreactor de la presente invención comprende un recinto rectangular alargado (12) -Fig. 1-, formado por un cuerpo transparente (21) que define las paredes laterales (22-a, 22-b, 22-c y 22-d) -Fig. 3- del recinto (12), unido en su porción superior a una tapa (41) -Fig. 1- y en su extremo inferior a una base (61) -Fig. 3-.

En una realización preferida de la invención, ilustrada en las figuras 1 y 3, el cuerpo (21) del biorreactor (10) tiene la forma de una caja rectangular alargada, en donde las paredes laterales (22-b y 22-d) son más largas que las paredes laterales (22-a y 22-c) -Fig. 3-.

El biorreactor (10) tiene dos extremos opuestos (14 y 15) -Fig. 5-. En el extremo (14) y adyacente a éste, se aloja la sección de cultivo (23) del biorreactor destinada a contener el cultivo (24), mientras que en el extremo (15) se aloja la sección (25) de almacenamiento del biorreactor destinada a contener el medio de cultivo líquido (26).



Instituto
Mexicano
de Propiedad
Industrial

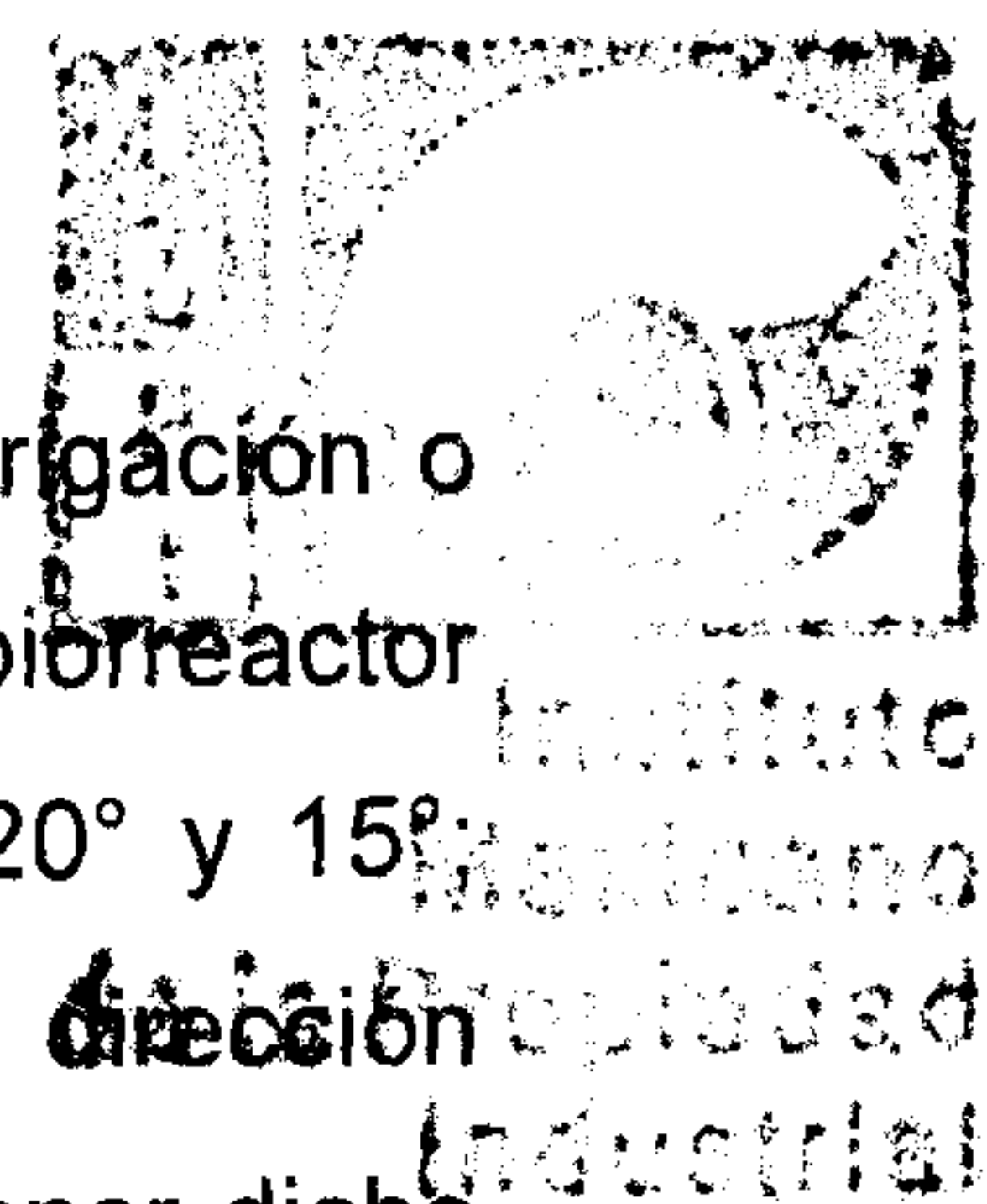
La sección de cultivo (23) está destinada a albergar el cultivo y puede dividirse en sub-cámaras (27) -Fig. 1-. Cada sub-cámara (27) puede, a su vez, recibir contenedores compartimentados (no ilustrados) para alojar ejemplares de pequeño tamaño. La sección de almacenamiento (25) -Fig. 5- aloja al medio de cultivo líquido y consiste de un contenedor opaco cuya función es la de proteger de la luz al medio de cultivo líquido durante los periodos de no inmersión o no irrigación y, al mismo tiempo, impedir el paso del material vegetativo.

La sección del cultivo puede ser dividida en dos o más sub-cámaras (27) mediante separadores (28) -Fig. 1-. Cada separador está preferentemente constituido por una placa provista de aberturas (29) -Fig. 3- en su parte inferior para permitir el paso del medio de cultivo líquido. Las aberturas (29) además previenen la turbulencia durante el flujo del medio de cultivo líquido y con ello se reduce en gran medida la formación de espuma, que afecta al cultivo. Como será evidente a un técnico en la materia, las aberturas (29) pueden consistir de ranuras, orificios o secciones con mallas, de cualquier geometría que permita el flujo del medio de cultivo líquido (26) -Fig. 5-.

Los separadores (28) se mantienen en una posición fija dentro del cuerpo (21) del biorreactor -Fig.1- . Para tal efecto, el cuerpo (21) incorpora guías verticales (30) que forman un canal para alojar los extremos laterales de los separadores (28) - Fig. 3-. Las guías (30) preferentemente mantienen una separación de algunos milímetros con respecto al fondo para facilitar la limpieza del cuerpo del biorreactor.

El biorreactor de la presente invención además incluye una cámara opaca (31) - Figs. 1 y 3-. Dicha cámara opaca (31) tiene por objeto proporcionar un espacio de almacenamiento para la contención del medio de cultivo líquido, durante la etapa de aireación del cultivo.

30



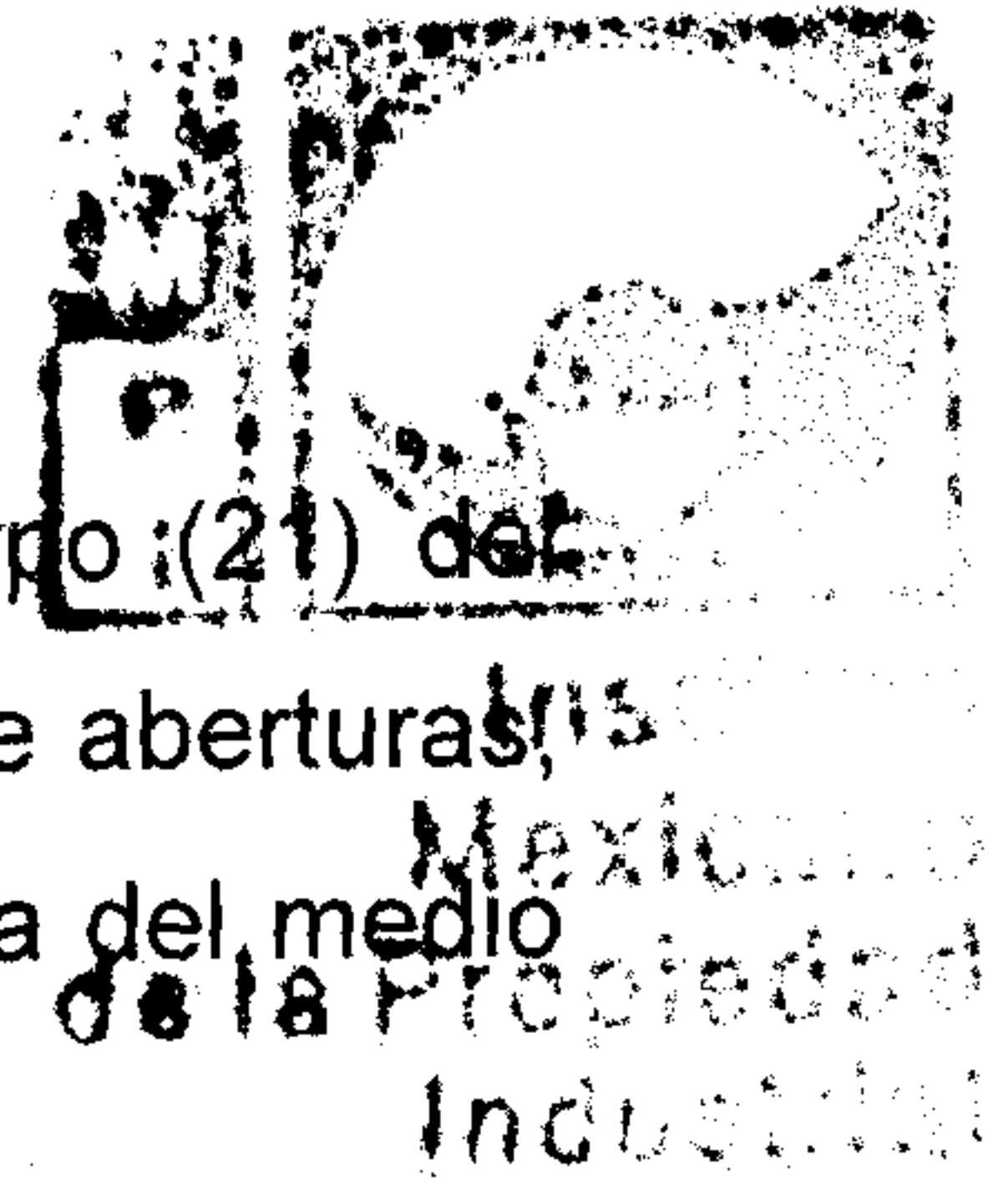
Como se advierte en la Fig. 5, el biorreactor se sujeta a periodos de irrigación o inmersión, y periodos de aireación. Durante el periodo de aireación, el biorreactor (10) -Fig. 1- se inclina en un ángulo determinado, por ejemplo entre 20° y 15° como consecuencia, el medio de cultivo líquido (26) se desplaza en la dirección del extremo (15) hacia la sección (25) del biorreactor destinada a contener dicho medio de cultivo líquido. Durante el periodo de aireación, el cultivo (24) queda en contacto con el aire que ingresa al biorreactor por los puertos (46) -Fig. 2-, así como bajo la influencia de la luz natural o una fuente adecuada de luz artificial, en tanto que el medio de cultivo líquido (26) se mantiene en la cámara opaca a cubierto de la acción de la radiación ultravioleta (UV) de la luz natural o artificial.

Durante los periodos de inmersión o irrigación, el biorreactor retoma la posición horizontal teniendo como consecuencia la inundación del recinto por el medio de cultivo líquido (26) que abandona la cámara opaca (31) -Fig. 1- y baña el cultivo (24) -Fig. 3-; el medio de cultivo penetra el tejido del cultivo y lo nutre.

A diferencia de los biorreactores de la técnica previa, el biorreactor se inclina sólo desde la horizontal hasta un ángulo predeterminado, por ejemplo: 15-20°, pero no de +20° a -20° pasando por la horizontal. Lo anterior resulta en una fuerte reducción en la formación de espuma y en una importante reducción en el movimiento del cultivo tal como la rotación, lo que previene que el cultivo se maltrate y asegura que las raíces permanezcan sustancialmente cerca del fondo del biorreactor.

La duración de cada una de las etapas de aireación e irrigación o inmersión, así como el tiempo en que se mantiene el ciclo depende de las características del cultivo.

En la realización ilustrada en la Fig. 3, la cámara opaca (31) comprende cuatro paredes laterales (32-a, 32-b, 32-c, 32-d) y una pared superior (32-e). Como se muestra en la Fig. 3, las paredes (32-b, 32-c y 32-d) son adyacentes y están



yuxtapuestas a las respectivas paredes (22-b, 22-c y 22-d) del cuerpo (21) del biorreactor; en tanto que la pared (32-a) de la cámara opaca (31) tiene aberturas a semejanza de los separadores (28), para permitir la entrada y salida de medio de cultivo líquido (26).

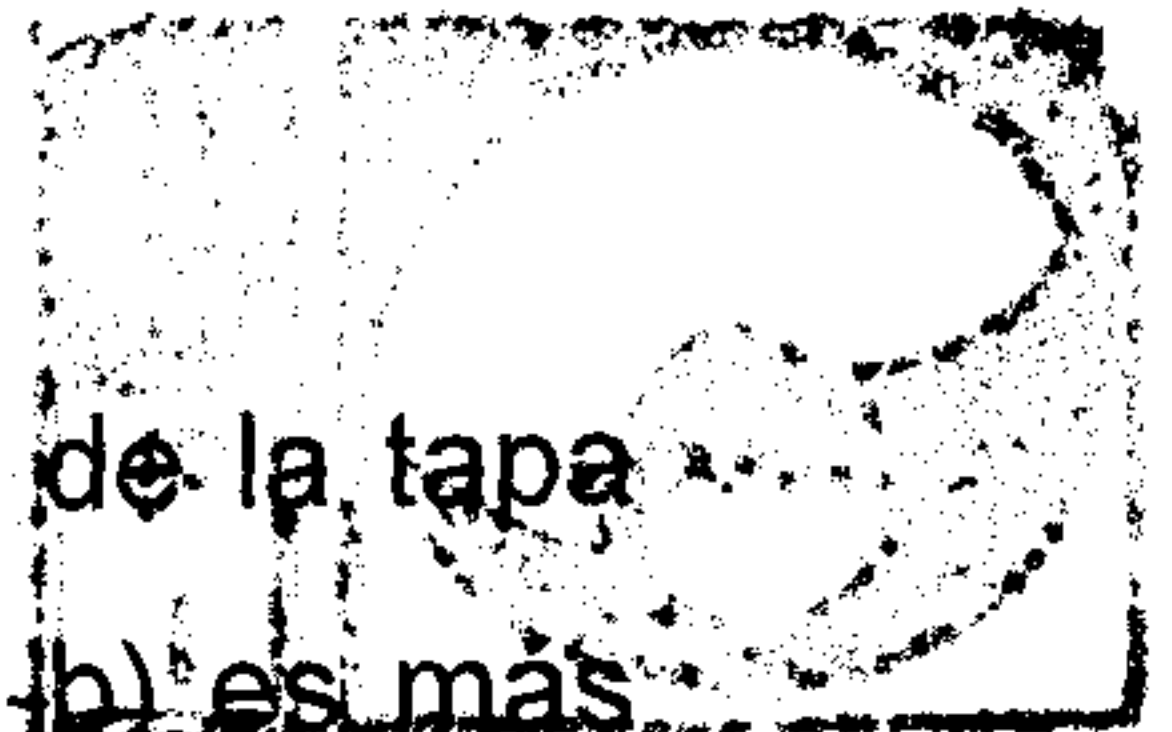
5

En la realización ilustrada en la Fig. 3, no se prevé la utilización de una pared de fondo opaca en virtud de que la base (61) del biorreactor (10) -Fig. 1- es opaca o al menos es opaca en la sección (25) -Fig. 5- destinada a contener dicho medio de cultivo líquido que corresponde a la cámara opaca (31). Sin embargo, como será
10 evidente a un técnico en la materia, el fondo (61) del biorreactor (10) puede ser translúcido o transparente y entonces puede ser conveniente instalar una pared de fondo opaca. La pared de fondo opaca puede convenientemente tener una pendiente formada por un espesor de pared de fondo que se reduce gradualmente, de manera que el espesor del fondo es mayor en el extremo
15 cercano a la pared (32-c), figura 3, -más cercano al extremo (15), figura 5 -, y disminuye hacia la pared (32-a) que tiene aberturas. Dicha pendiente favorece el vertido del medio de cultivo líquido (26) hacia la sección de cultivo (23) del biorreactor destinada a contener el cultivo (24) -Fig. 5-.

20 Una guía (33) -Fig. 3- permite colocar y mantener la cámara opaca en una posición fija. La altura de la cámara opaca (31) es menor que la respectiva del cuerpo del biorreactor (21) -Fig. 1-. La pared superior (32-e) de la cámara opaca (31) incorpora un asa (34) -Fig. 3- para facilitar su manejo, remoción y limpieza.

25 TAPA

La tapa (41) cubre la parte superior del recinto (12) -Fig. 1 y Fig. 2-. La tapa (41) es translúcida o transparente para permitir el paso de la luz hacia el material biológico. En una realización de la invención, la tapa (41) está provista de un sistema de cierre (42) y de puertos (46) para permitir el intercambio gaseoso con
30 el ambiente y la extracción o introducción de fluidos líquidos o gaseosos.



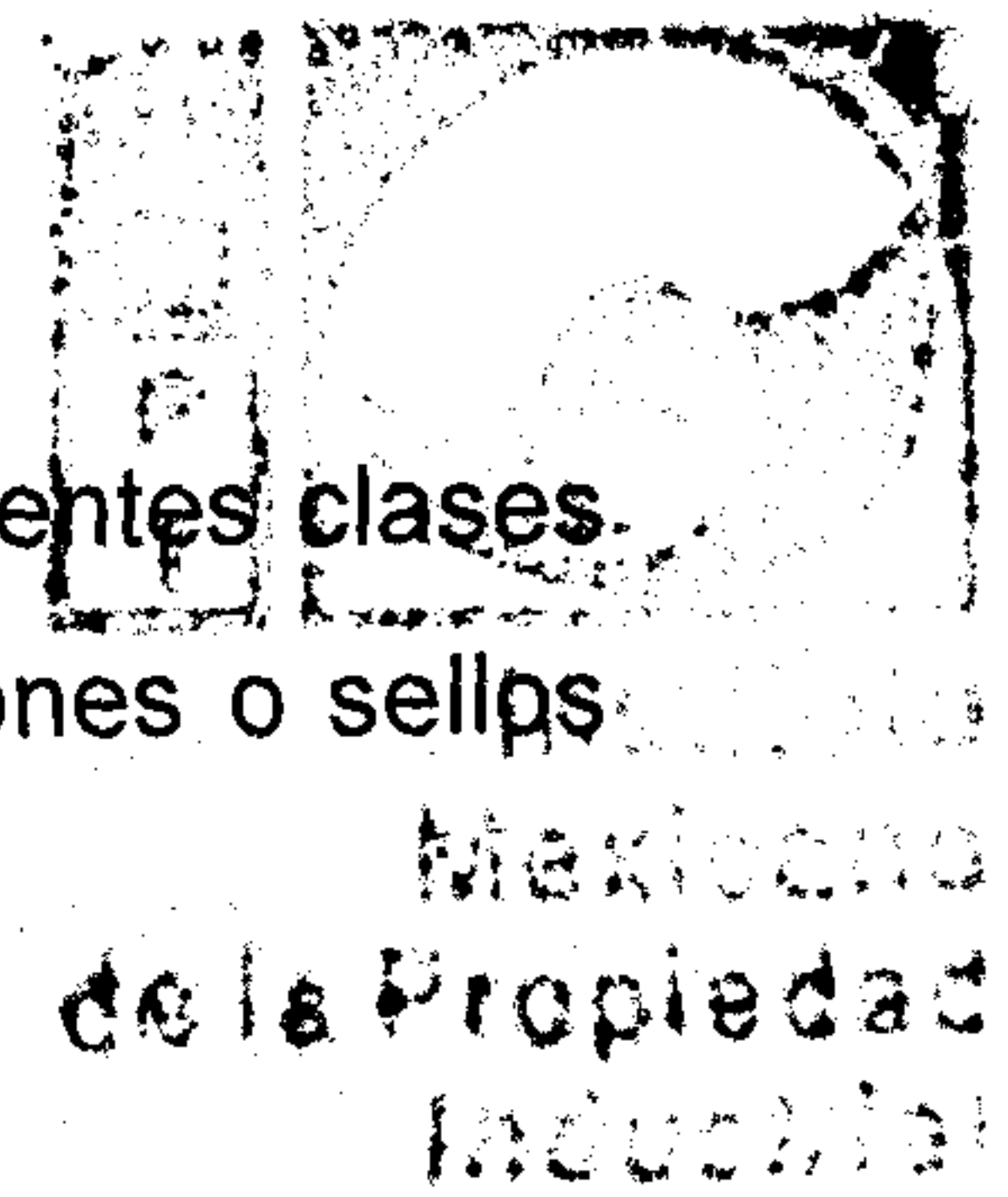
En una realización de la invención ilustrada en la Fig. 2, el cierre (42) de la tapa (41) comprende una doble ceja de cierre, en donde la ceja interior (43-b) es más ancha que la ceja exterior (43-a). Dichas cejas (43-a y 43-b) en conjunto constituyen un canal perimetral (44) de cierre, que permite la colocación de un sello hermético o empaque (45) que puede ser poroso o de cualquier otro tipo.

La tapa (41) posee dos o más puertos (46) -Fig. 2-. En la realización de la invención ilustrada en las figuras, cada uno de los puertos (46) comprende un cuerpo tubular (47), delimitado por paredes (48-a) con sus extremos superior (49-a) e inferior (49-b) abiertos. El extremo superior (49-a) está unido en su circunferencia a un orificio (52) formado sobre la superficie de la tapa (41).

En la realización de la invención ilustrada en la Fig. 2, el puerto (46) se representa como un cuerpo (47) cilíndrico confinado dentro del recinto (12) del biorreactor (10), de manera que el cuerpo cilíndrico se extiende desde la cara inferior de la tapa (41). De esta manera, los puertos (46) no protruyen de la superficie de la tapa (41). Dicha configuración, resulta en una superficie de tapa plana en donde es posible apilar de manera segura dos, tres o más biorreactores. Así, se optimiza la operación del equipo de balanceo (80), pues éste puede operar con el mayor número posible de biorreactores. El biorreactor de la presente invención puede incluir pernos y orificios para apilar de manera segura dos o más biorreactores.

El cuerpo cilíndrico (47) del puerto (46) comprende, además, una ceja (54) unida al lado interior de la pared cilíndrica (48-a) en el extremo inferior (49-b) del cuerpo (47). Dicha ceja tiene un hueco o espacio anular. En la realización ilustrada en la Fig. 2 dicha ceja se muestra como un anillo aplanado. El espacio anular de la ceja (54) define el orificio inferior (53) del puerto (46). Como se ilustra en la Fig. 2, el orificio inferior (53) tiene un diámetro menor que el correspondiente diámetro del orificio superior (52).

30



Los puertos (46) del biorreactor tienen por objeto alojar filtros de diferentes clases y materiales para el intercambio gaseoso, así como servir como tapones o sellps para la extracción o la introducción de fluidos líquidos o gaseosos.

5 Como se ha mencionado, el puerto (46) está unido con la tapa (41), por debajo de ésta. Pero, como será evidente a un técnico en la materia, el puerto (46) puede también estar formado por la unión del cuerpo cilíndrico (47) sobre la tapa (41).

10 La tapa (41) puede incluir medios de cierre a presión tales como pequeñas depresiones y protuberancias que se colocan en la tapa y el cuerpo (21) para que la tapa se cierre a presión. Además, puede incluir bisagras para que la tapa no se separe del biorreactor, así como cualquier medio conocido para asegurar la tapa firmemente al cuerpo del biorreactor.

15 BASE OPACA

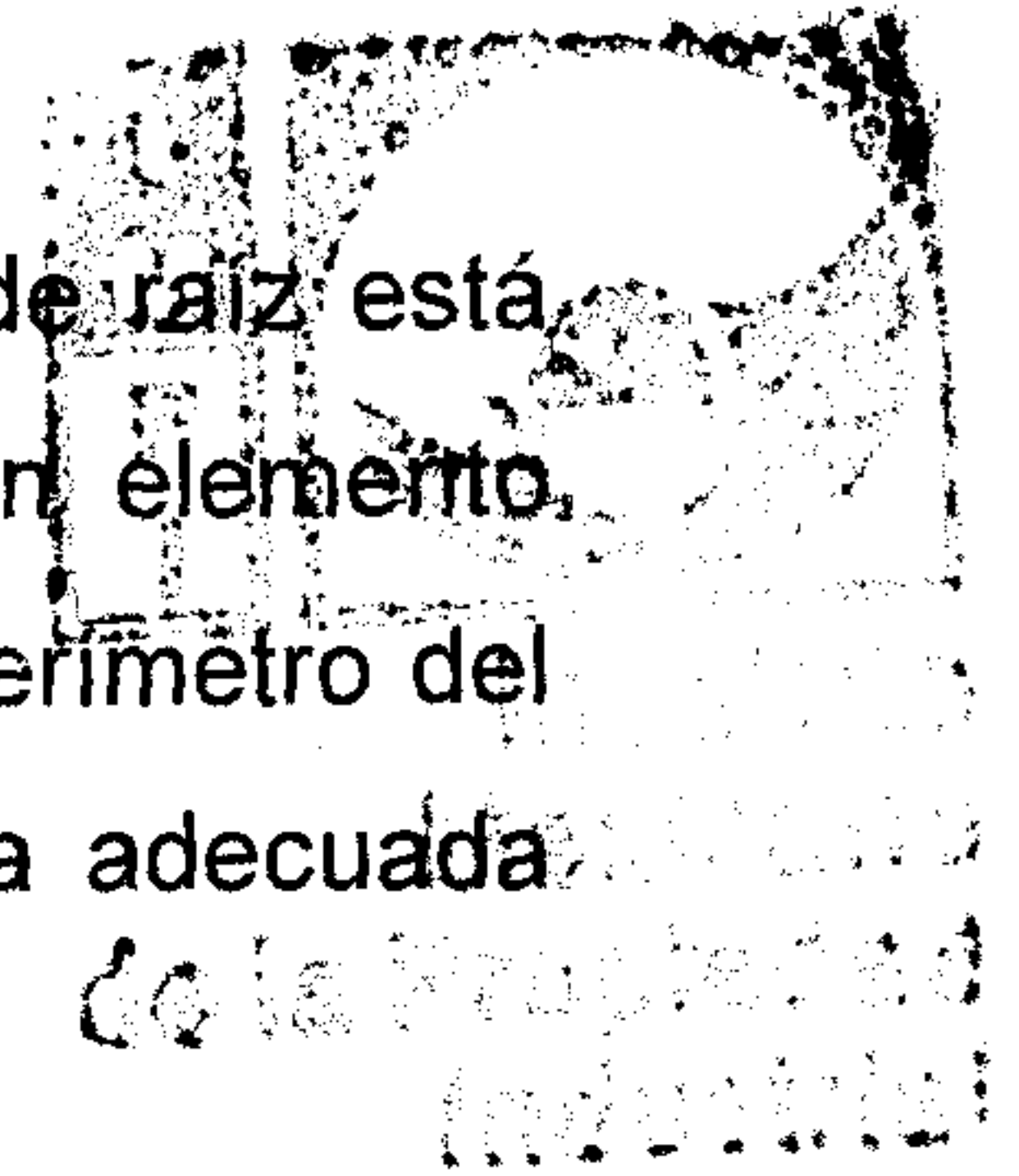
La base (61) -Fig. 3- tiene por objeto cerrar la abertura inferior del biorreactor (10).

20 En una modalidad de la invención, la base (61) es opaca con objeto de complementar el bloqueo del paso de la luz hacia el medio de cultivo, contenido en su respectiva cámara, así como proteger a la cámara de cultivo para reducir los efectos de la luz sobre las raíces de las plantas. La luz tiene un efecto benéfico sobre las hojas de una planta, pero su efecto sobre las raíces es nocivo, por tanto la protección de las raíces es deseable en un biorreactor.

25

30 Como se ilustra en la Fig. 3, la base incluye una banda opaca de protección de las raíces (63) que comprende las pestañas (63-a, 63-b, 63-c y 63-d) que se yuxtaponen sobre una porción inferior de la cara externa de las paredes (22-a, 22-b, 22-c y 22-d) del cuerpo (21) del biorreactor (10). Dichas bandas (63) protegen a las raíces del cultivo del efecto pernicioso de la luz.

En la realización ilustrada en la Fig. 1, la banda (63) de protección de raíz está integrada a la base (61), sin embargo, la banda (63) puede ser un elemento independiente, tal como una película adhesiva que se adhiera en el perímetro del cuerpo (21) en su cara exterior; dicha banda (63) tiene una anchura adecuada como para sólo proteger las raíces del cultivo.



La base además incluye válvulas o conexiones (no mostradas) para drenar el medio de cultivo líquido (26) -Fig.5- degradado y/o para suministrar medio de cultivo líquido fresco.

10

El biorreactor -Fig. 1- está preferentemente fabricado en un material polimérico. El cuerpo (21) y la tapa (41) son translúcidos y, preferentemente, transparentes, en tanto que la base (61) y la cámara opaca (31) están hechas de un material opaco o pigmentado que evita el paso de la luz.

15

El biorreactor puede ser esterilizado empleando diversas técnicas físicas o químicas, como radiación gamma, agua hirviendo, autoclaves con líquido caliente a presión, jabones y detergentes, y sustancias químicas. Además, los materiales de construcción deben tener un buen desempeño mecánico, sobre todo, resistencia al impacto y a esfuerzos cortantes. Estas propiedades deberán ser retenidas en las condiciones ambientales de uso del biorreactor que incluyen el tiempo de cultivo en el medio de cultivo líquido, exposición periódica a la luz UV natural o artificial, almacenamiento y transporte; es decir, los materiales deberán tener una larga durabilidad. Entre los materiales que cumplen estas características está un grupo selecto de polímeros formado por el policarbonato, polimetilmetacrilato, polimetilpenteno, polipropileno, polisulfona, poliestireno y polímeros similares.

20

25

EQUIPO DE BALANCEO

30

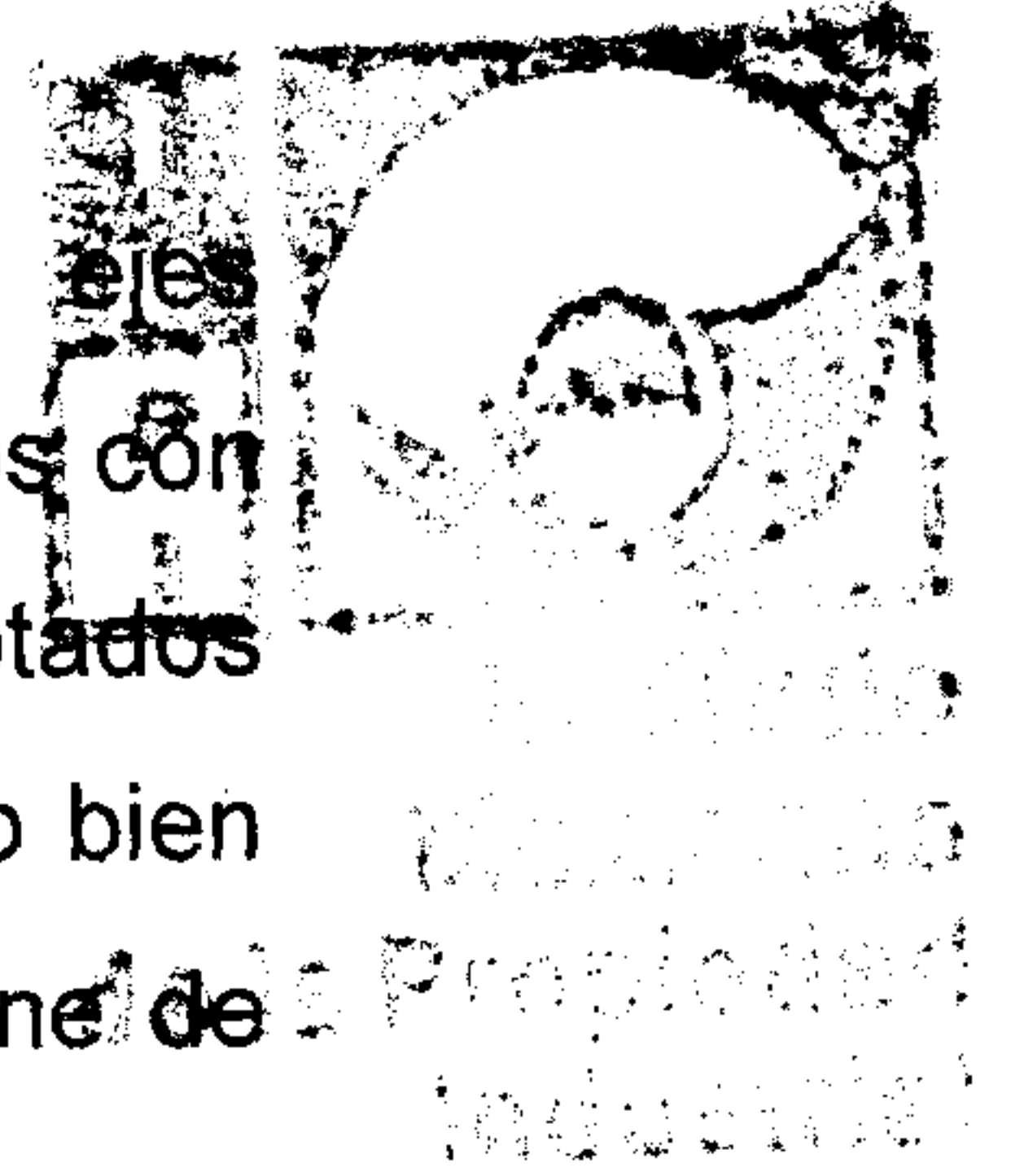
El movimiento basculante de un biorreactor o grupo de biorreactores es proporcionado por un equipo de balanceo (80). El equipo de balanceo (80) se ilustra en la Fig. 4. El equipo de balanceo (80) está integrado por un bastidor o armazón fijo (81) de soporte. Dicho armazón (81) soporta un mecanismo basculante (82), el cual está acoplado al armazón de manera movable. El mecanismo basculante (82) incluye una o varias plataformas basculantes (84, 85), asociadas de manera operativa a un motor (86) unido a un émbolo o brazo que produce un movimiento ascendente y descendente que se transmite a la plataforma o grupo de plataformas (84, 85). El equipo de balanceo (80) incorpora además una fuente de luz artificial (93), unida al armazón (81) o al armazón basculante (88) que soporta las plataformas (84, 85) del mecanismo basculante (82), para proveer iluminación al cultivo. El equipo de balanceo (80) incluye además mecanismos o dispositivos de control (98) de la velocidad, del tiempo de encendido y apagado, para proporcionar un programa de operación que regule el movimiento de las plataformas basculantes (84, 85), las fuentes de luz artificial (93) y su intensidad, con el fin de establecer las condiciones óptimas para cada cultivo.

El armazón opcionalmente incluye una serie de rodajas (99) para facilitar el traslado o su cambio de lugar cuando sea requerido.

Cada plataforma (84, 85) permite la colocación, fijación y aseguramiento de uno o más biorreactores (10), que contienen el cultivo (24) y el medio de cultivo líquido (26) -Fig.5-. Las plataformas (84, 85) pueden tener diferentes formas y tamaños, de las cuales la forma rectangular es la preferida, ya que permite un mejor aprovechamiento de los espacios.

Cada una de las plataformas está unida a la estructura por medio de un pivote (91) en el centro de los bordes opuestos, dichos pivotes (91) o ejes permiten bascular a la plataforma, es decir, que la plataforma se desplace angularmente en torno del eje. Así, un lado de la plataforma asciende en tanto que el lado opuesto desciende

en torno del eje. Alternativamente, la plataforma puede incorporar dos ejes alineados en dos extremos opuestos de la plataforma. En el caso de equipos con varias plataformas se requiere unir las plataformas con brazos móviles, pivotados para que el movimiento basculante se transmita de una plataforma a otra, o bien pivotar el armazón para que todo éste, incluyendo las plataformas, se incline de acuerdo a los ángulos requeridos.

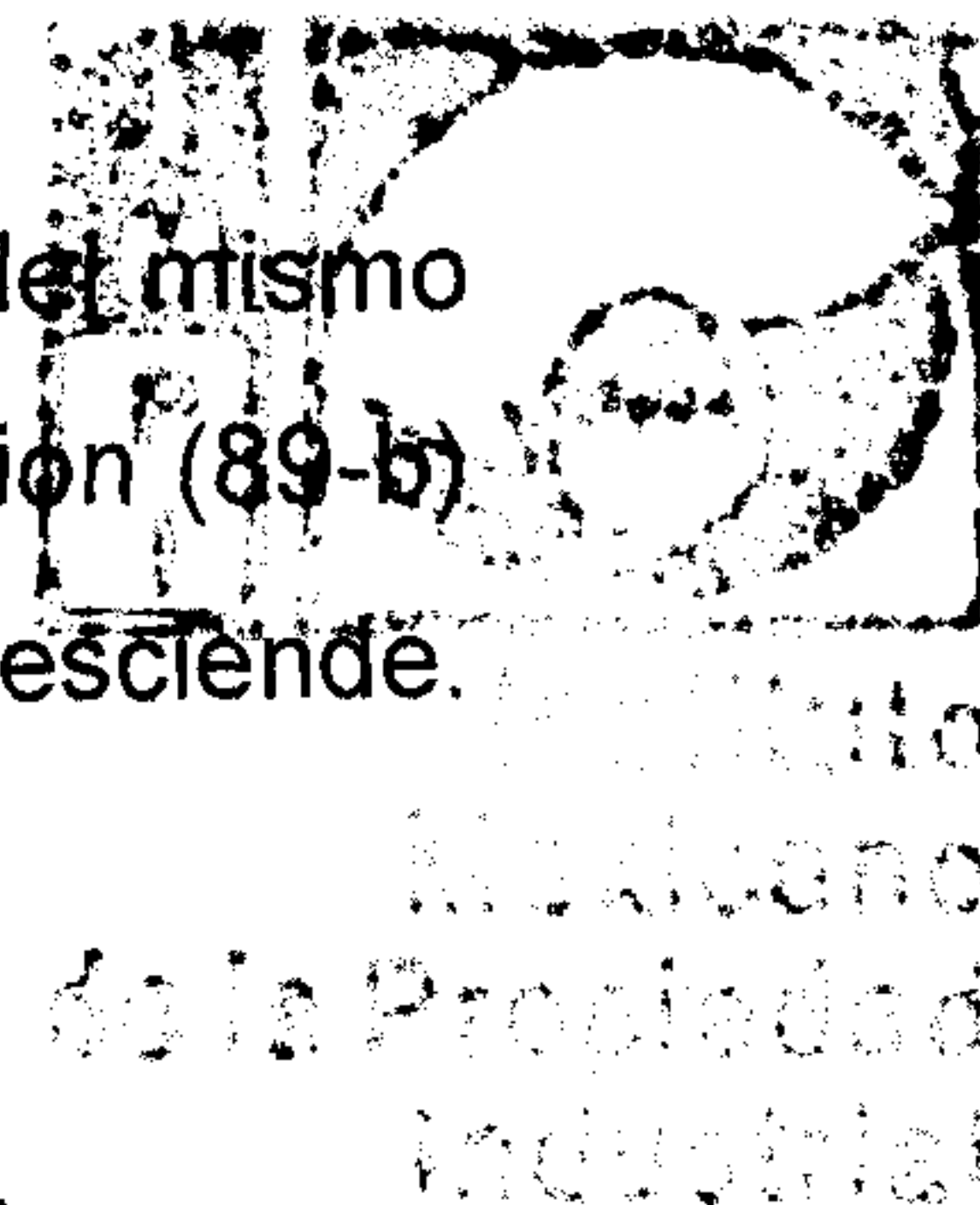


El motor (86) del equipo de balanceo (80) -Fig. 4- puede ser hidráulico, neumático, eléctrico o mecánico, o una combinación parcial o total de ellos, siendo preferido el mecanismo electromecánico. El motor (86) está acoplado a un brazo o émbolo (87), en uno de sus extremos. El émbolo (87) está acoplado en el extremo opuesto al mecanismo basculante (82) que incorpora las plataformas (84, 85) en las que yace al menos un biorreactor (10). El motor (86) produce un movimiento de vaivén que se transmite al émbolo, es decir, en un primer tiempo el émbolo (87) del motor se desplaza axialmente alejándose del motor, mientras que en un segundo tiempo el émbolo (87) se retrae axialmente acercándose al motor e integrándose con el mismo. El émbolo (87) está orientado verticalmente, de manera que el movimiento de vaivén se traduce en un movimiento alternado, ascendente y descendente.

El mecanismo basculante (82) consiste de un armazón (88) basculante, el cual está unido al armazón (81) del equipo de balanceo (80) por medio de pivotes (91). Los pivotes (91) proporcionan un medio para que el armazón basculante (88) pueda moverse dentro del armazón (81) del equipo de balanceo (80), bajo la acción del motor (86). El émbolo (87) está unido al armazón basculante en una posición separada del pivote (91).

En uso, el motor (86) produce un primer movimiento que transmite al émbolo, cuyo extremo asciende axialmente (se extiende en la dirección de su eje), transmitiendo este movimiento ascendente al armazón basculante (88). Debido a que el armazón basculante está unido por medio de los pivotes (91) al armazón fijo (81) del equipo de balanceo (80), la primera porción (89-a) del armazón basculante

(88), – entre el pivote (91) y el extremo lateral (94-a) –, gira alrededor del mismo (91) elevando dicha primera porción (89-a), al mismo tiempo que la porción (89-b) que se extiende entre el pivote (91) y el extremo lateral (94-b) opuesto, desciende. El resultado es la inclinación del armazón basculante (88).



5

En un segundo tiempo, el motor produce el movimiento complementario que se traduce en una retracción del émbolo en la dirección de su eje. El émbolo (87) transmite el movimiento descendente al armazón basculante (88). Como el armazón está pivotado, la primera porción (89-a) gira alrededor del pivote (91) descendiendo al mismo tiempo que asciende la segunda porción (89-b) que gira alrededor del pivote (91). Como resultado el armazón basculante recupera su posición original.

10

En una primera realización de la invención, el movimiento descrito se utiliza para producir la inclinación del armazón basculante (88) en un ángulo de entre 25 y 15 grados en un primer tiempo y para que, en un segundo tiempo, el armazón basculante (88) recupere la horizontal, es decir, el ángulo de inclinación sea de 0°. Sin embargo, un técnico en la materia encontrará obvio que el movimiento descrito se diseñe para que en el primer tiempo el armazón basculante (88) alcance una inclinación determinada (entre 0° y 30°), y en el segundo tiempo se invierta dicha inclinación para alcanzar el ángulo contrario (0° a -30°).

15

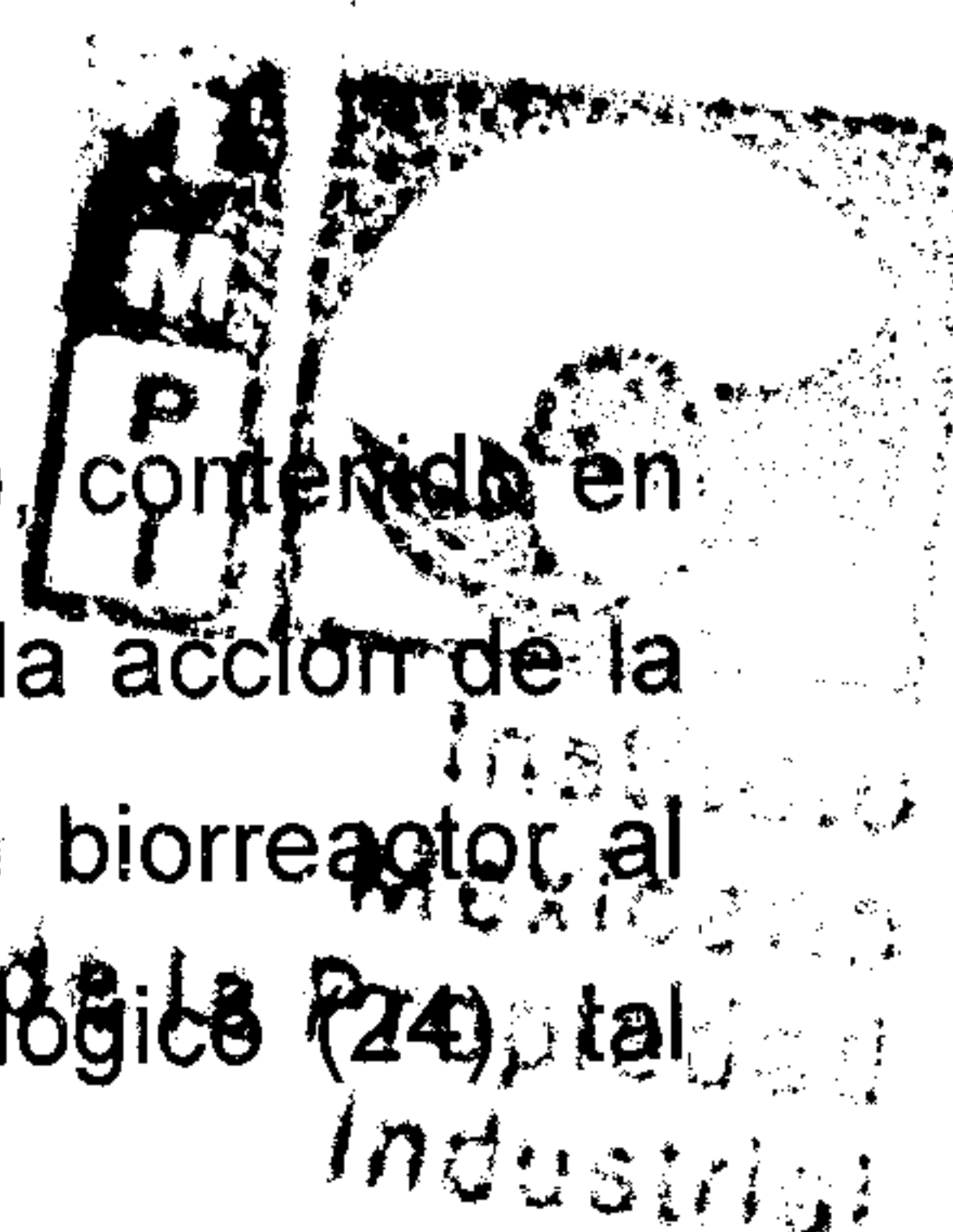
20

El armazón basculante (88) está unido, a su vez, a una o más plataformas (84, 85), de modo que éstas giran también en torno de sus pivotes y adoptan la posición determinada por el armazón basculante (88).

25

Los biorreactores se colocan y aseguran sobre las plataformas. Además, pueden apilarse varios biorreactores. El eje longitudinal de los biorreactores (10) debe quedar orientado de manera perpendicular al pivote (91), de la manera ilustrada en las figuras 4 y 5.

30



El movimiento basculante hace que el medio de cultivo líquido (26), contenido en cada biorreactor (10) colocado sobre las plataformas (84, 85), por la acción de la gravedad fluya fácilmente y sin restricciones del extremo (14) del biorreactor al extremo opuesto (15), lo que permite cultivar *in vitro* material biológico (24), tal como se muestra en la Fig. 5.

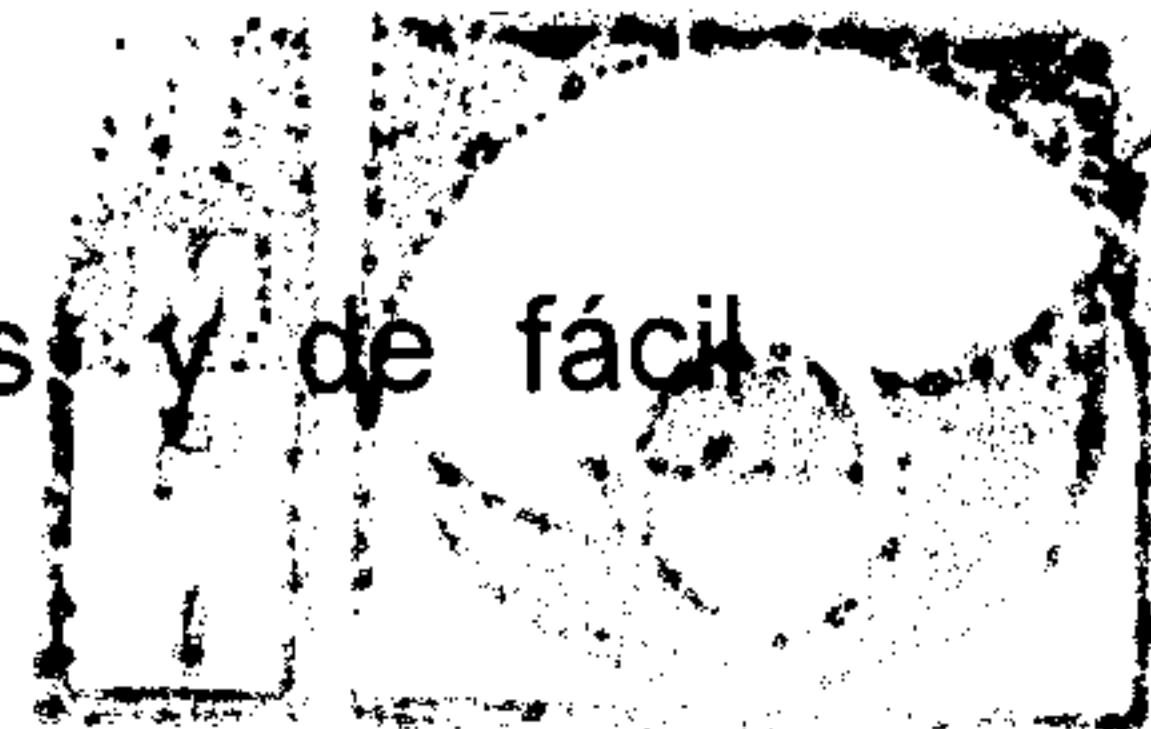
La fuente de luz artificial (93) del equipo de balanceo (80) consiste esencialmente en una fuente de luz visible, preferentemente una lámpara de luz visible que opcionalmente incluye un dispositivo reflector de luz. La fuente de luz artificial (93) hace incidir la luz visible sobre cada biorreactor (10) y esta fuente de luz visible es programada según los periodos requeridos de luz y oscuridad. En la Fig. 4 la fuente de luz artificial (93) consiste en una lámpara fluorescente, fijada a la porción superior del armazón fijo (81), sin embargo, se puede utilizar bombillas o cualquier otro medio de iluminación que puede estar colocado en cualquier posición adecuada del armazón fijo (81) o basculante (88).

El mecanismo de control (98) del equipo (80) es de tipo eléctrico, electromecánico o electrónico, que comprende principalmente controladores electrónicos programables. El mecanismo de control (98) permite programar el movimiento basculante de los biorreactores (10). El mecanismo de control determina los tiempos de operación, la velocidad de los desplazamientos, la forma (continua o discontinua) para producir respectivamente ciclos de inmersión- aireación o sólo ciclos de inmersión en el cultivo *in vitro* de material biológico (24).

Así, este equipo (80) proporciona un movimiento basculante al biorreactor o grupo de biorreactores en forma continua o discontinua, cíclica y programable, para producir en el biorreactor ciclos temporales alternados de inmersión o irrigación y aireación. Cuando el movimiento basculante es discontinuo se puede establecer una mayor duración de uno de los ciclos, ya sea el de inmersión o el de aireación.

30

Todo lo anterior permite operar biorreactores autónomos, móviles y de fácil manejo y mantenimiento.



En la realización en donde la base (61) -Fig. 3- es completamente opaca, la fuente de luz artificial (93) se coloca en varios puntos del equipo de balanceo (81). Lo anterior para asegurar que la luz alcance a todos los biorreactores colocados en el equipo de balanceo (80). Alternativamente, puede utilizarse una o más lámparas tubulares colocadas de manera vertical.

10 TIPO DE MATERIALES

El cultivo puede consistir de cualquier tipo de material vegetal, por ejemplo: células, tejidos, órganos, embriones, o plántulas. Preferentemente embriones y plántulas.

15

El material vegetal incluye cualquier especie vegetal, por ejemplo: caña de azúcar, flores, frutas, árboles y arbustos.

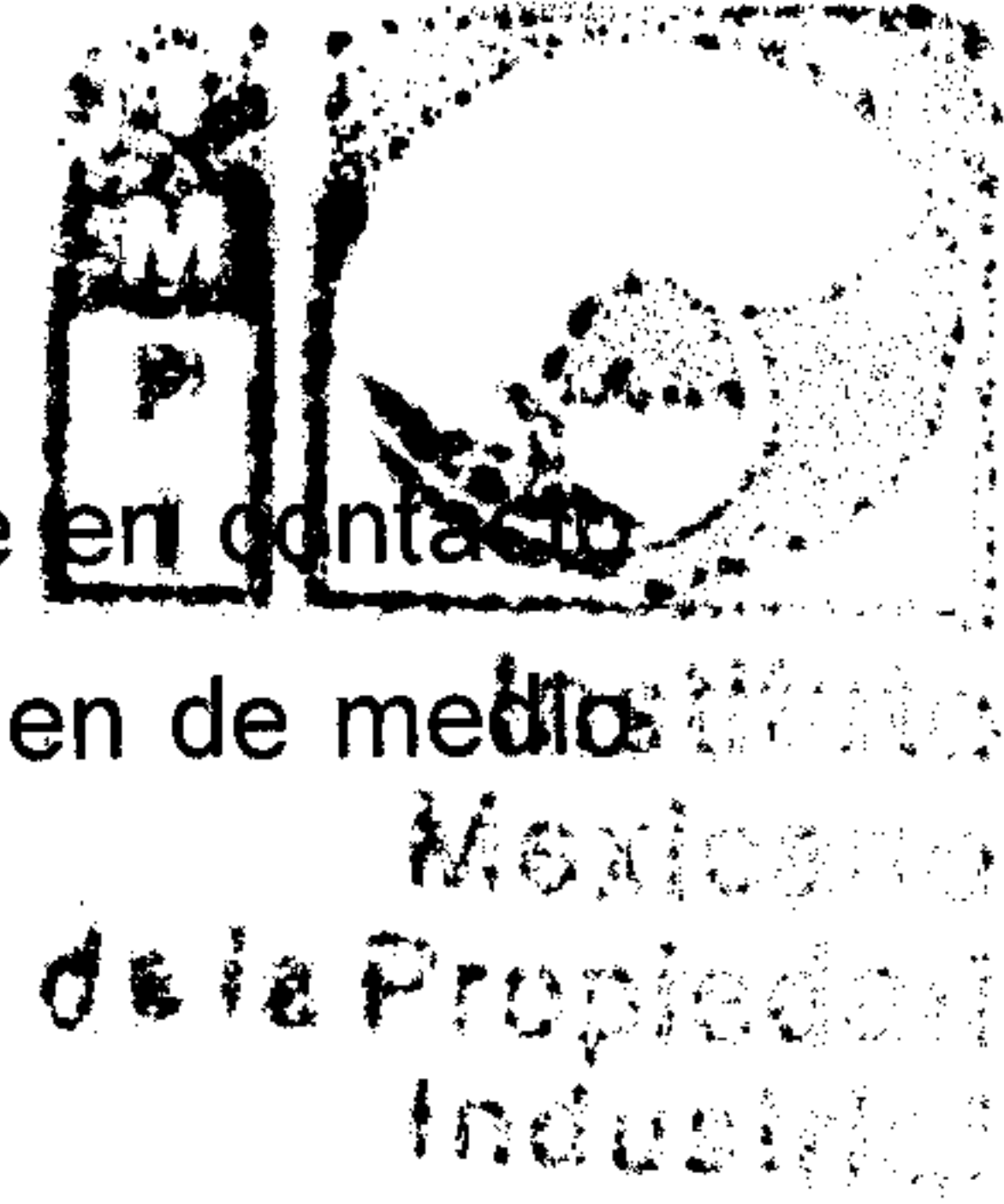
20

El medio de cultivo líquido es cualquier líquido que proporcione nutrientes a estos cultivos.

Las ventajas que presenta este biorreactor son las siguientes:

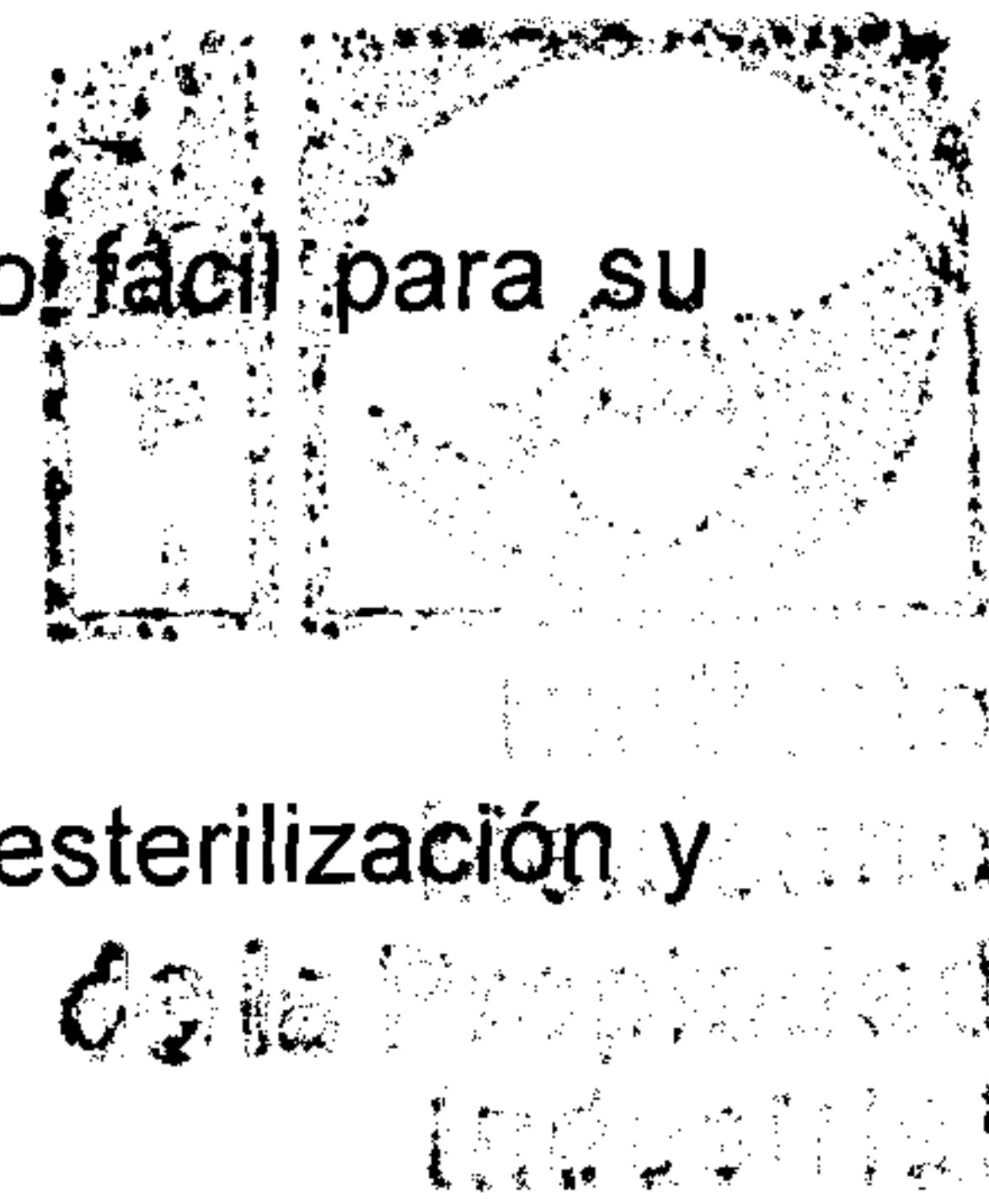
25

- a - El medio de cultivo siempre se encuentra confinado en compartimentos estancos, sin uniones removibles que puedan dar lugar a fugas de líquido.
- b - El medio de cultivo fluye fácilmente y sin restricciones desde su alojamiento opaco a la luz hasta el material cultivado y viceversa.



- c – La inclinación necesaria para que el medio de cultivo entre en contacto con las raíces de las plántulas es muy pequeña, por lo que el volumen de medio de cultivo resulta significativamente reducido.
- 5 - d – Gracias a su base opaca, las raíces de las plántulas quedan menos expuestas a los efectos de la radiación luminosa y ultravioleta del ambiente.
- e – El acceso al material cultivado es rápido y franco gracias a su tapa integral, cuya transparencia permite la transmisión de la luz y facilita la observación del cultivo.
- 10 - f - La tapa dispone de puertos para el intercambio gaseoso con el ambiente y para el suministro o extracción de sustancias líquidas o gaseosas.
- 15 - g - El material biológico permanece separado durante su cultivo en sub-cámaras que impiden su aglomeración.
- h – Estas sub-cámaras, que pueden variar en tamaño y en número, se convierten fácilmente en una cámara única en caso de que el tamaño de los especímenes así lo requiera.
- 20 - i – Los especímenes de menor tamaño pueden alojarse, a su vez, en compartimentos más pequeños situados dentro de las sub-cámaras para facilitar su manejo y proteger su integridad.
- 25 - j – Este biorreactor es completamente desarmable, lo que facilita su limpieza y esterilización.
- k – La forma del biorreactor y el movimiento basculante permiten obtener ciclos de inmersión y aireación mediante la inmersión temporal del material
- 30

biológico, sin un movimiento excesivo de este último, y un acceso fácil para su colocación y extracción.



5 - l – La forma y tamaño del biorreactor (10) permiten su fácil esterilización y transporte de las áreas estériles a las áreas de cultivo.

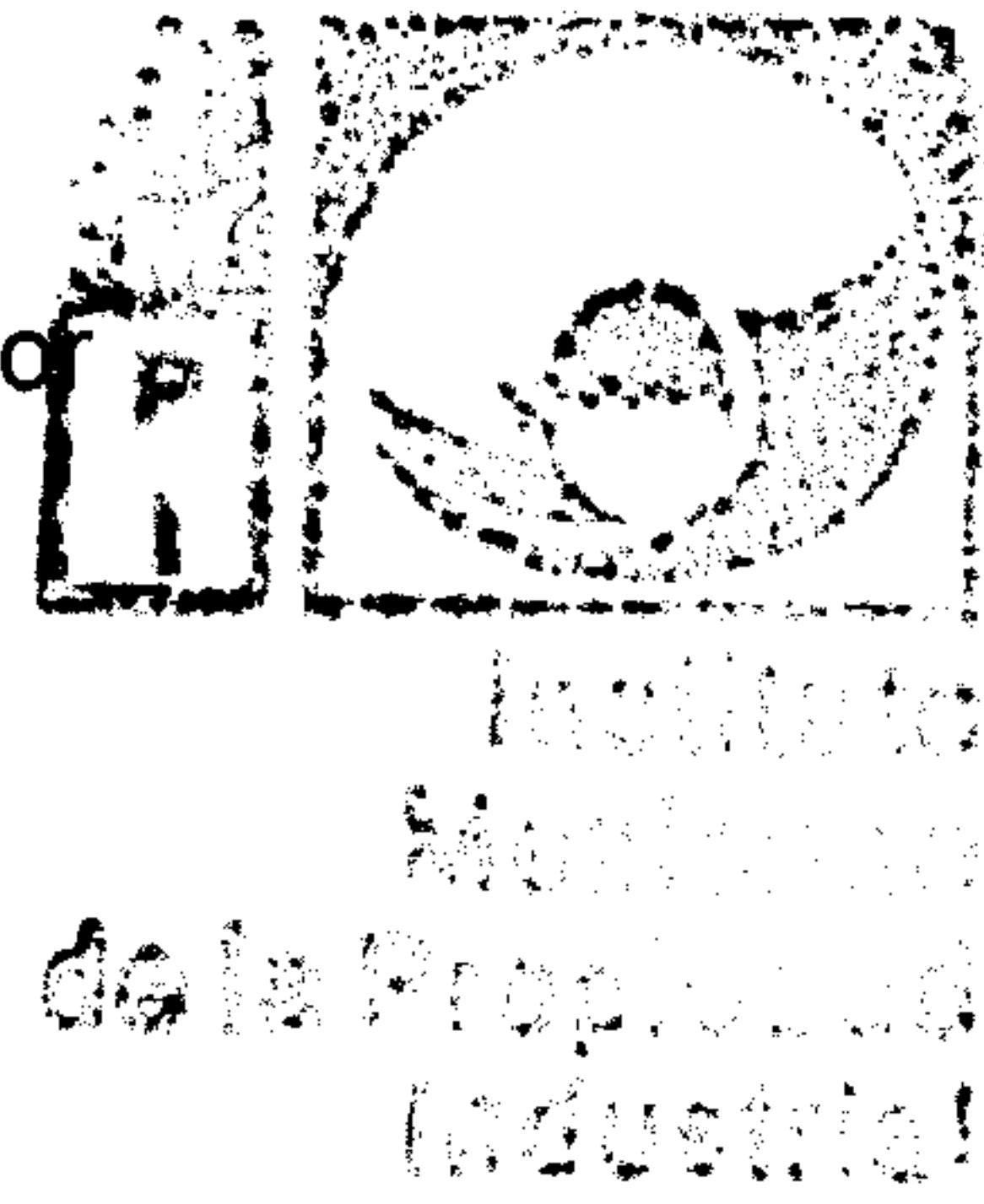
- m – El biorreactor está formado por un número reducido de piezas, lo que hace que su manejo y ensamblaje sean muy sencillos.

10 - n – Los materiales de elaboración del biorreactor (10) son esterilizables, con un buen desempeño mecánico a las temperaturas y condiciones de esterilización; transparentes y resistentes a la degradación UV.

15 - ñ – El diseño de cada una de las piezas que conforman el biorreactor (10), permite alcanzar un cierre hermético cuando es armado; permite que el biorreactor (10) sea de capacidad intermedia y variable; facilita el llenado, vaciado y cambio de medios de cultivo líquidos (26) –Fig.5-, la carga y descarga del material biológico (24) -Fig. 5- y, en caso de ser necesario, facilita el suministro de fluidos líquidos o gaseosos o sustancias químicas, y la aireación forzada del biorreactor
20 (10).

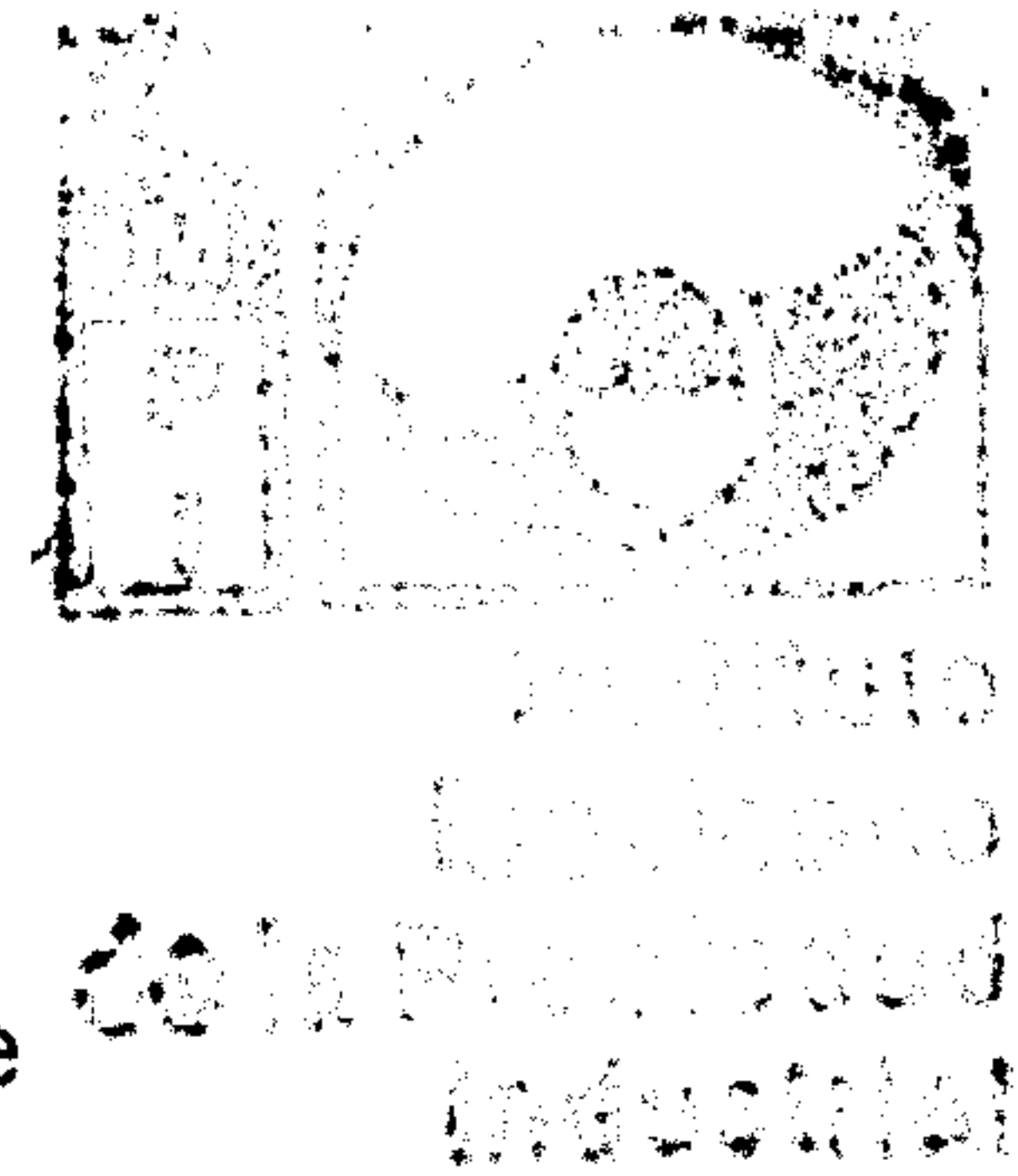
- o – El biorreactor (10) tiene un bajo costo de producción unitaria y de operación.

25	10	Biorreactor
	12	Recinto alargado rectangular
	14, 15	Extremos opuestos del biorreactor
	21	Cuerpo transparente
	22-a, 22-b, 22-c y 22-d	Paredes laterales del recinto
30	23	Sección de cultivo del biorreactor
	24	El cultivo



25	Sección de almacenamiento del biorreactor
26	Medio de cultivo líquido
27	Sub-cámaras
28	Separadores
5 29	Aberturas
30	Guías de los separadores
31	Cámara opaca
32-a, 32-b, 32-c y 32-d	Paredes laterales de la cámara opaca
32-e	Pared superior de la cámara opaca
10 33	Guía de la cámara opaca
34	Asa de la cámara opaca
41	Tapa
42	Sistema de cierre
43-a	Ceja exterior de cierre
15 43-b	Ceja interior de cierre
44	Canal perimetral de cierre
45	Empaque de cierre
46	Puertos
47	Cuerpo cilíndrico del puerto
20 48-a	Paredes del puerto
49-a	Extremo superior del puerto
49-b	Extremo inferior del puerto
52	Orificio superior de la tapa
53	Orificio inferior del puerto
25 54	Ceja anular del puerto
61	Base
63	Banda de protección de raíz
63-a, 63-b, 63-c y 63-d	Pestañas de cierre de base
80	Equipo de balanceo
30 81	Armazón fijo
82	Mecanismo basculante

	84, 85	Plataformas
	86	Motor
	87	Émbolo
	88	Armazón basculante
5	89-a	Primera porción del armazón basculante
	89-b	Segunda porción del armazón basculante
	91	Pivote
	93	Fuente de luz artificial
	94-a, 94-b	extremo lateral del armazón basculante
10	98	Mecanismo de control
	99	Rodajas



REIVINDICACIONES



- 1.- Un biorreactor para el cultivo *in vitro* de material biológico por inmersión temporal en un medio de cultivo líquido, que opera bajo una etapa de inmersión y una etapa de aireación alternadas, que tiene un recinto alargado rectangular, formado por un cuerpo, una base y una tapa, en donde el recinto alargado es translúcido y tiene una sección de cultivo para el material biológico y una sección de almacenamiento para la contención del medio de cultivo líquido en las cuales fluye el medio de cultivo líquido, caracterizado porque la sección de almacenamiento comprende una cámara opaca que protege de la luz al medio de cultivo líquido durante la etapa de aireación.
- 2.- El biorreactor para el cultivo *in vitro* de material biológico por inmersión temporal en un medio de cultivo líquido de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la cámara opaca comprende paredes laterales, una pared superior y opcionalmente un fondo opaco.
- 3.- El biorreactor para el cultivo *in vitro* de material biológico por inmersión temporal en un medio de cultivo líquido de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque la cámara opaca comprende una pared con aberturas adyacente a la sección de cultivo para permitir la entrada y salida del medio de cultivo líquido.
- 4.- El biorreactor para el cultivo *in vitro* de material biológico por inmersión temporal en un medio de cultivo líquido de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la base del biorreactor es opaca por lo menos en la sección de almacenamiento del medio de cultivo líquido.
- 5.- El biorreactor para el cultivo *in vitro* de material biológico por inmersión temporal en un medio de cultivo líquido de conformidad con la reivindicación 4, caracterizado porque la base del biorreactor es completamente opaca.



6.- El biorreactor para el cultivo *in vitro* de material biológico por inmersión temporal en un medio de cultivo líquido de conformidad con la reivindicación 4, caracterizado porque el cuerpo del biorreactor tiene una porción inferior adyacente a la base con una banda opaca de protección de las raíces de la acción de la luz, alrededor de la porción inferior del cuerpo del biorreactor.

7.- El biorreactor para el cultivo *in vitro* de material biológico por inmersión temporal en un medio de cultivo líquido de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la sección de cultivo para el material biológico incluye sub-cámaras para el cultivo individualizado de material biológico.

8.- El biorreactor para el cultivo *in vitro* de material biológico por inmersión temporal en un medio de cultivo líquido de conformidad con la reivindicación 7, caracterizado porque las sub-cámaras se forman por medio de separadores que consisten de una placa provista con aberturas en su parte inferior, para permitir el paso del medio de cultivo líquido.

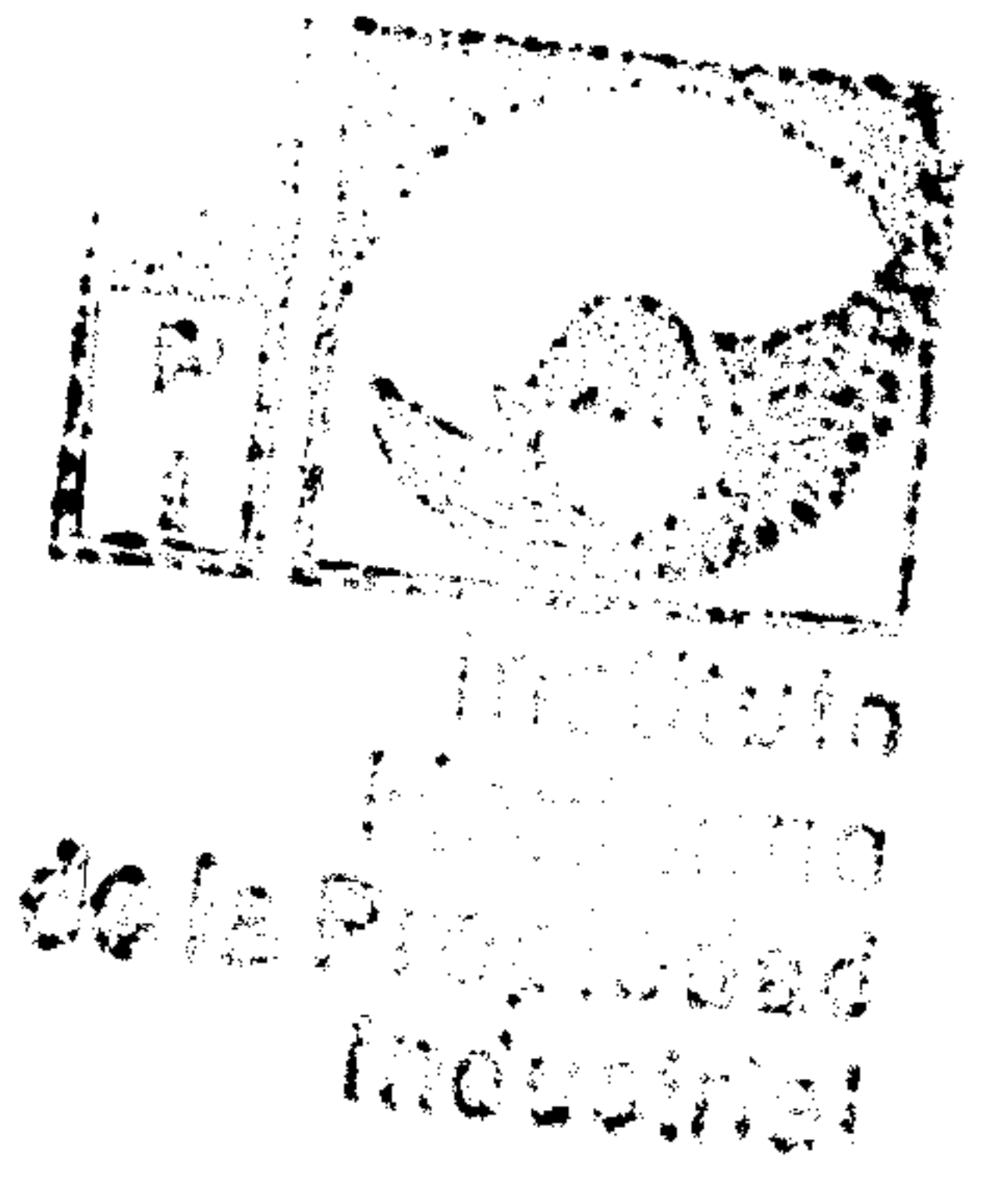
9.- El biorreactor para el cultivo *in vitro* de material biológico por inmersión temporal en un medio de cultivo líquido de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la tapa comprende puertos para permitir el intercambio gaseoso con el ambiente y la extracción o introducción de fluidos líquidos o gaseosos, así como la colocación de filtros.

10.- El biorreactor para el cultivo *in vitro* de material biológico por inmersión temporal en un medio de cultivo líquido de conformidad con la reivindicación 9, caracterizado porque la tapa es plana y cada puerto comprende un cuerpo tubular con sus extremos superior e inferior abiertos, el cuerpo tubular estando unido en su extremo superior a un orificio formado sobre la superficie de la tapa, y estando unido en su extremo inferior a una ceja que forma un espacio anular que define un orificio inferior de menor diámetro que el orificio del extremo superior.

RESUMEN



Se describe un biorreactor para el cultivo de especies y tejidos vegetales por los métodos de inmersión temporal o de irrigación temporal, el cual consta de dos cámaras situadas dentro de un recinto común transparente, cubiertos por una tapa común, transparente, provista de doble borde de cierre y de puertos para permitir el intercambio gaseoso con el ambiente y la extracción o introducción de fluidos líquidos o gaseosos. La presente invención está relacionada con un sistema para el cultivo *in vitro* de material biológico, preferentemente material vegetal de cualquier especie como células, tejidos, órganos, embriones vegetales o plántulas, preferentemente embriones y plántulas.



1/4

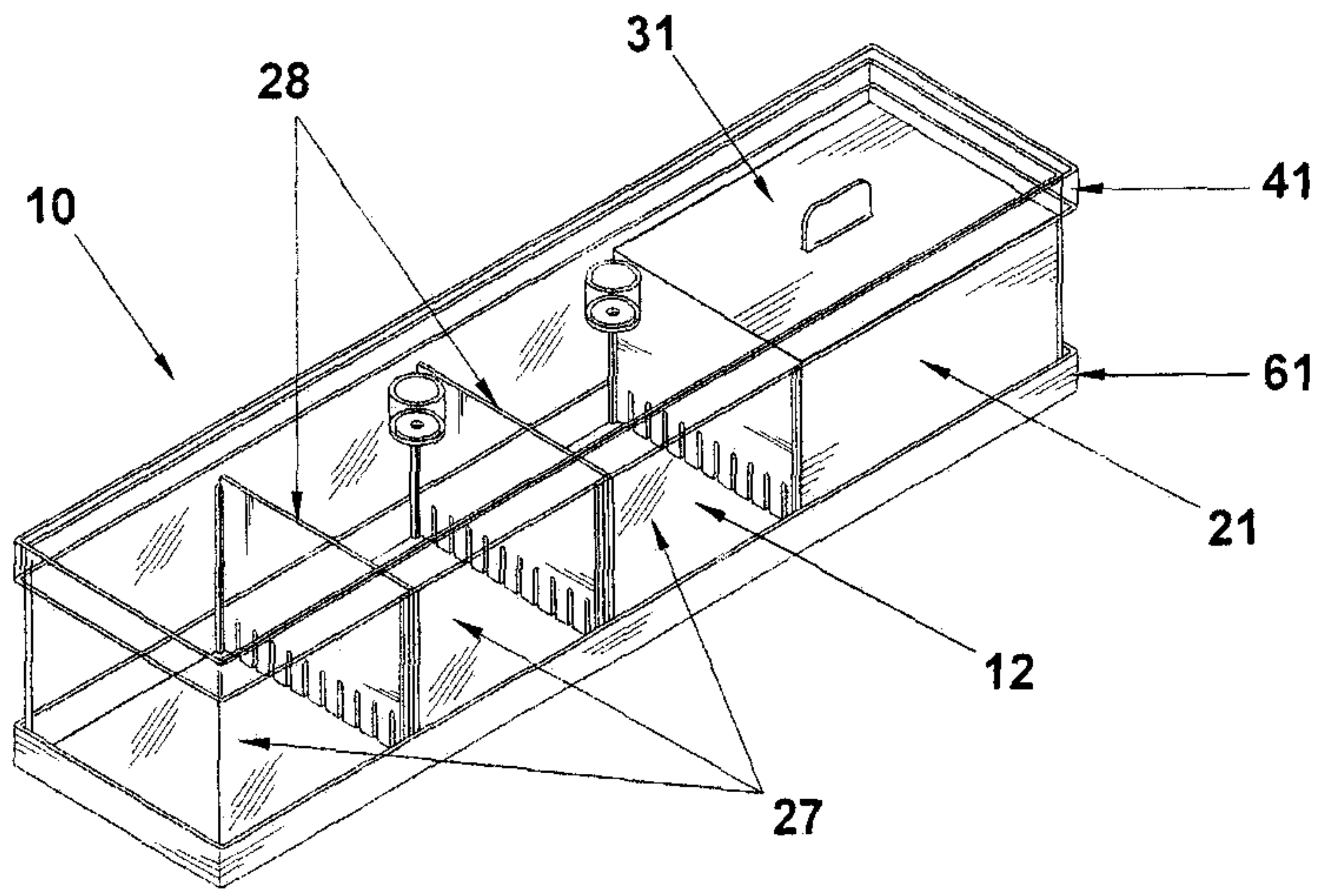


FIG. 1

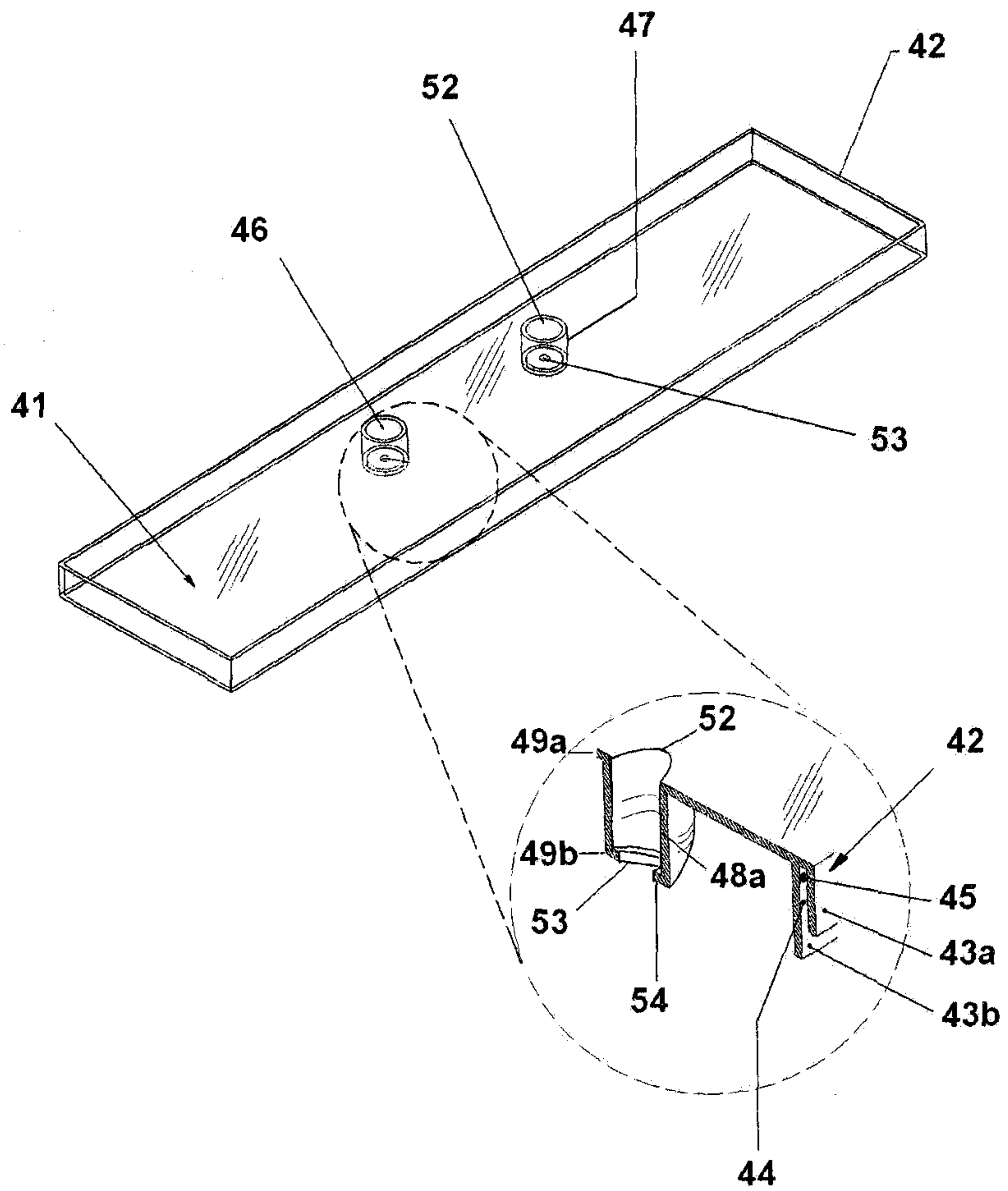


FIG. 2



Instituto
Tecnológico
de México

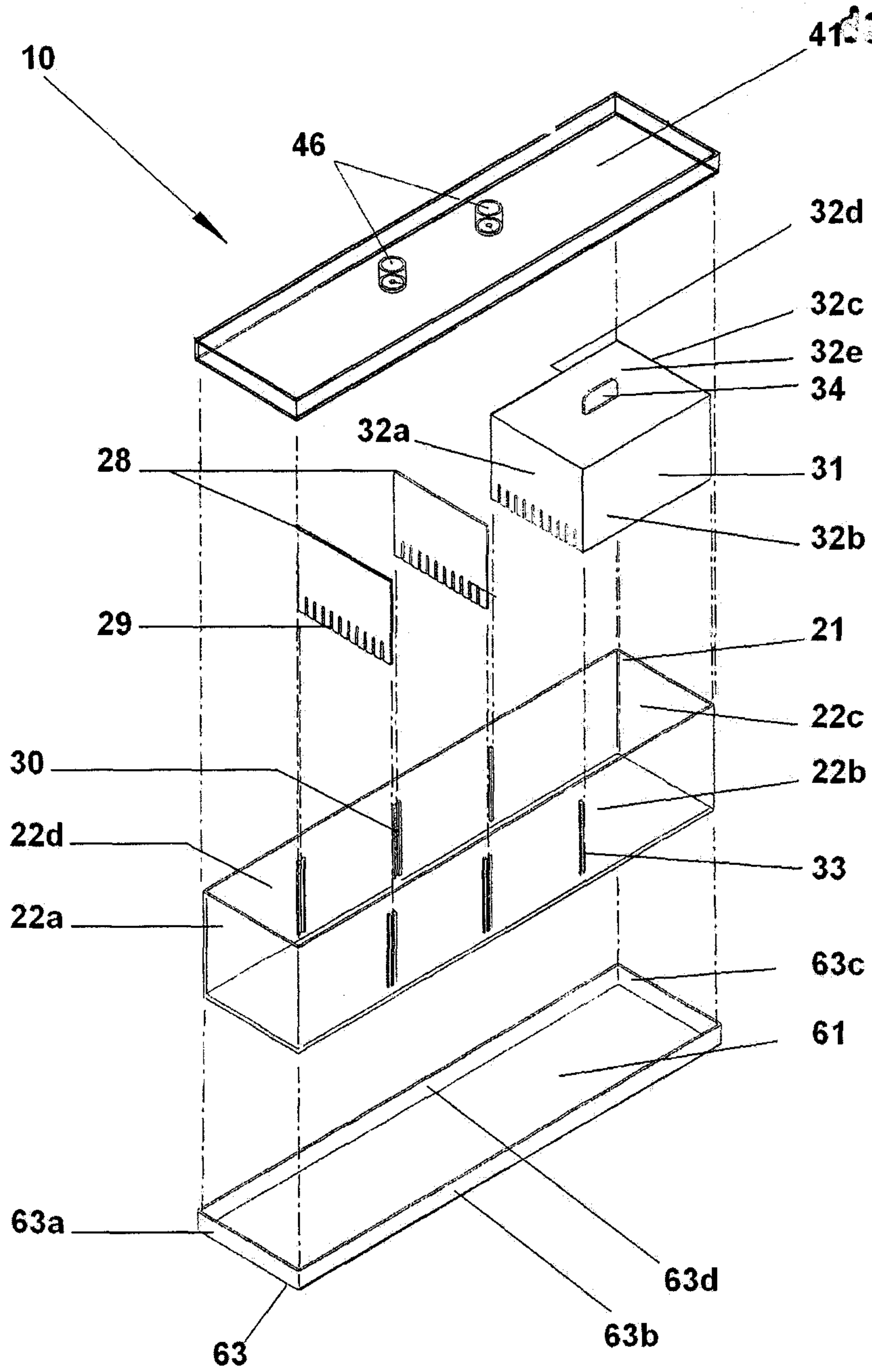
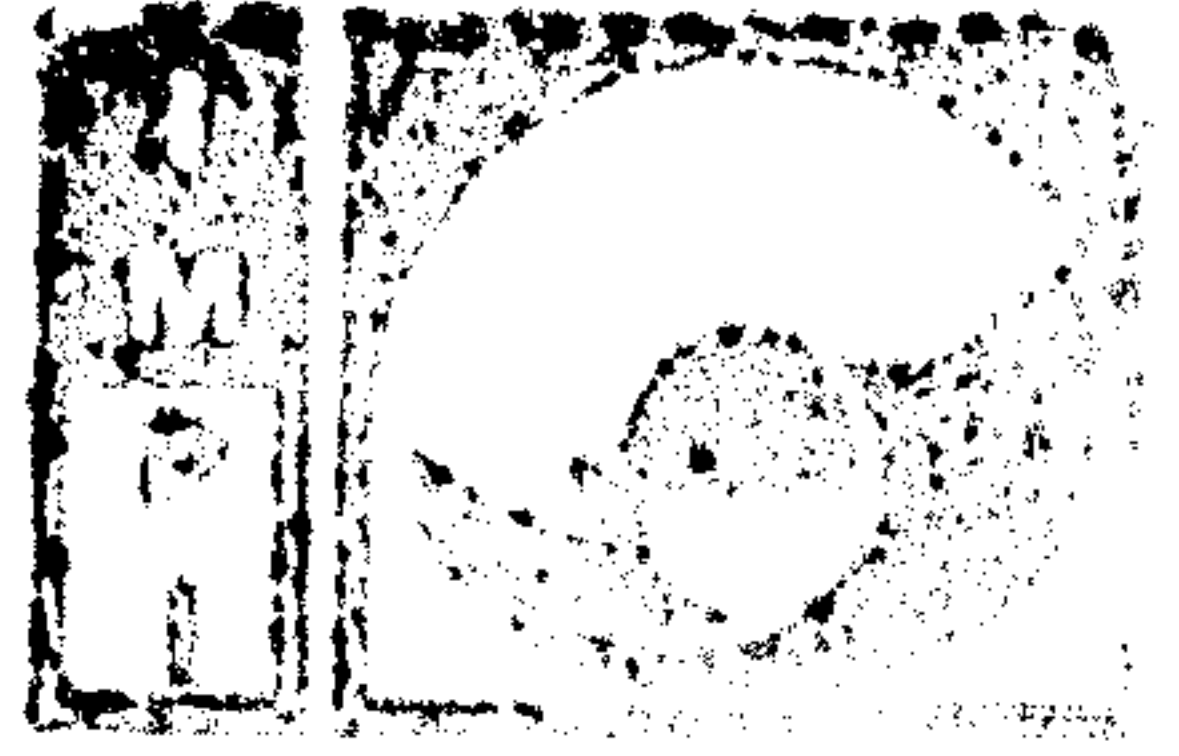


FIG. 3



Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial

3/4

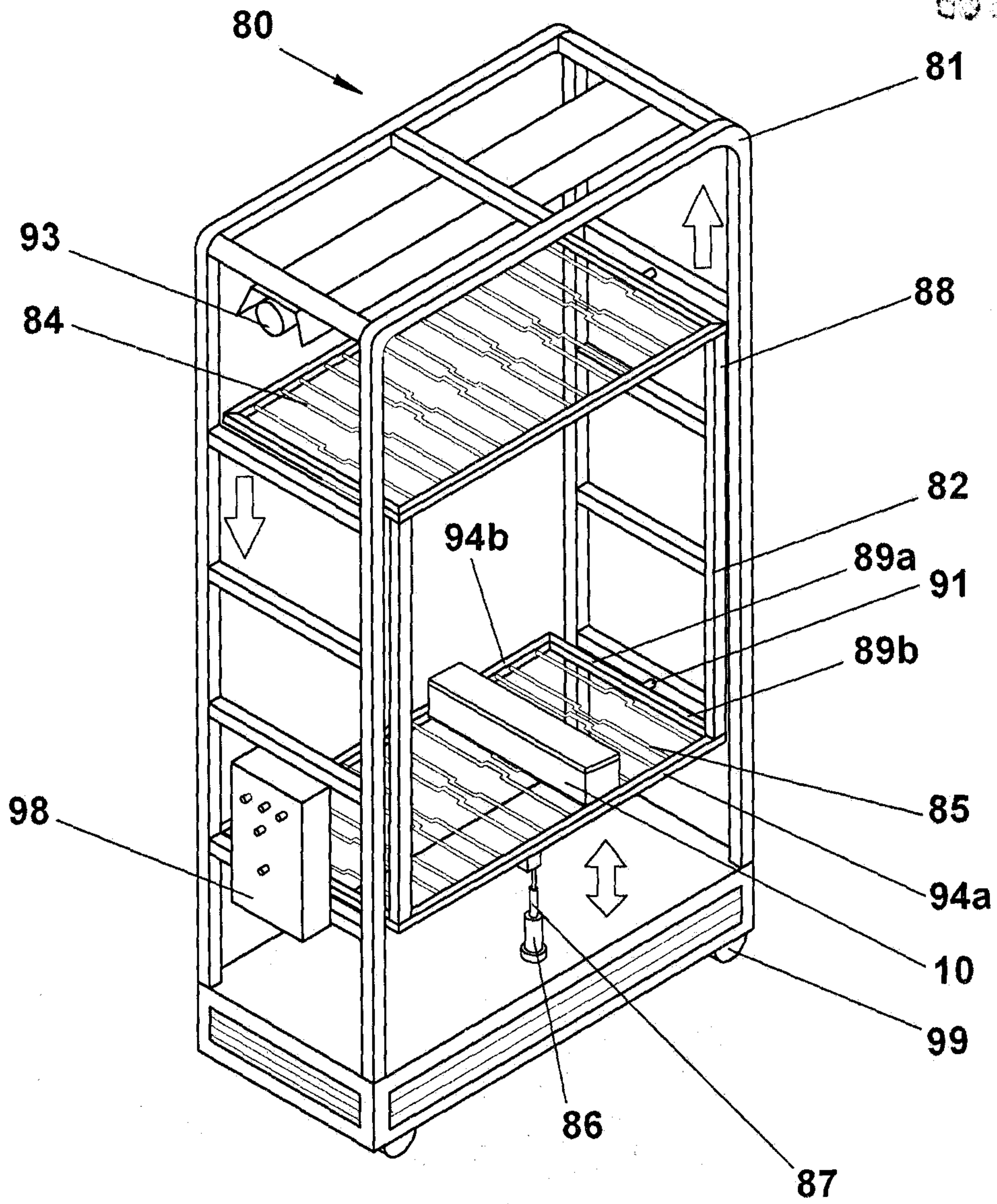


FIG. 4

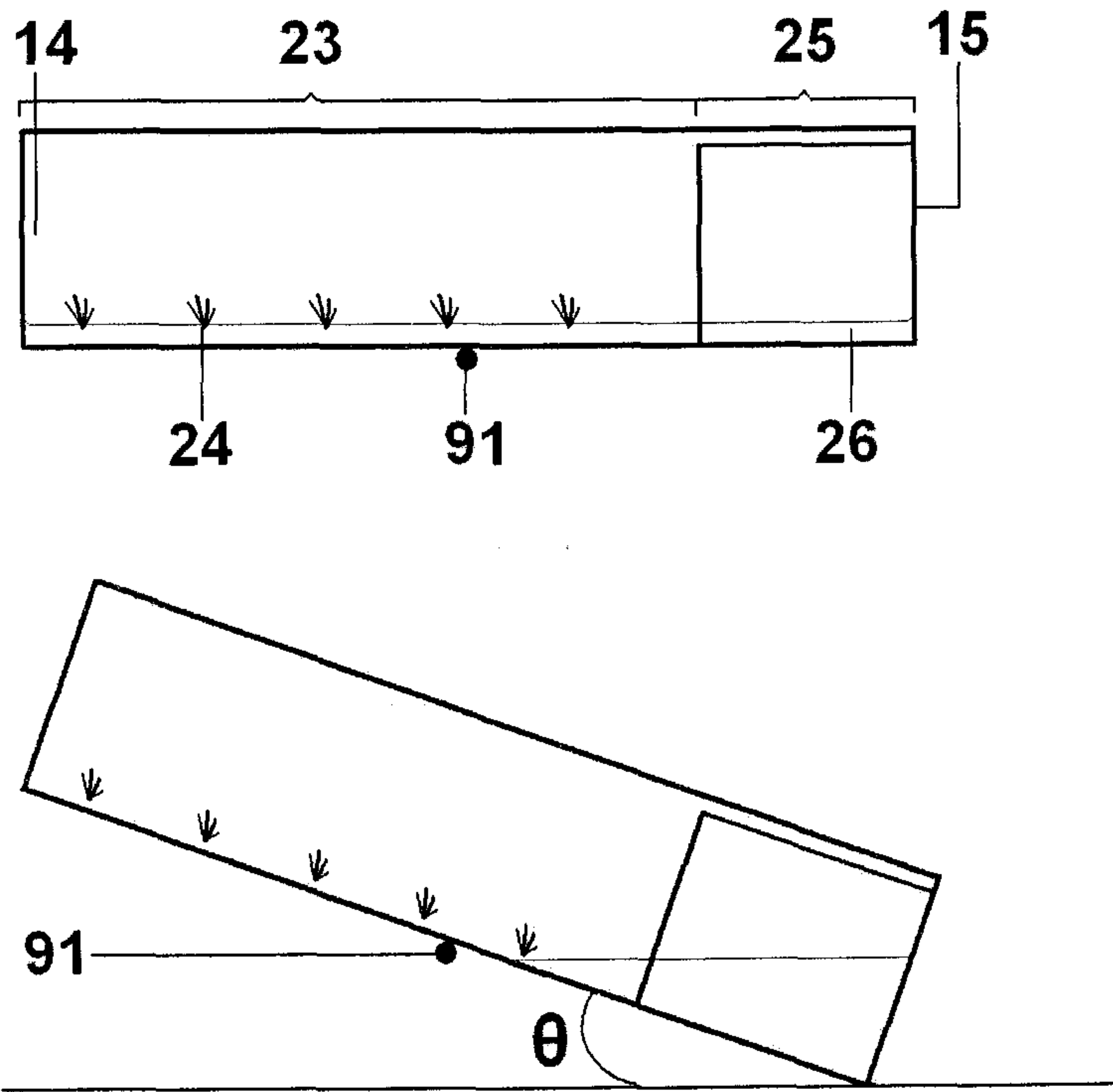


FIG. 5