(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 875 792**

(51) Int. CI.:

***C12P 19/04*** (2006.01)
***B29C 39/14*** (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.05.2017 E 17172847 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.05.2021 EP 3406728**

(54) Título: **Método para producir celulosa sin tejer sintetizada de manera bacteriana**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
**11.11.2021**

(73) Titular/es:

**JENACELL GMBH (100.0%)**
**Göschwitzer Str. 22**
**07745 Jena, DE**

(72) Inventor/es:

**KRALISCH, DANA y**
**PFAFF, ELENA**

(74) Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

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**

Método para producir celulosa sin tejer sintetizada de manera bacteriana

La presente invención se refiere a un método para producir celulosa sin tejer de una manera biotecnológica (BC, de sus siglas en inglés), así como a la BC sin tejer producida por el método y los usos de dicha BC sin tejer. La presente invención se refiere también a un aparato para la producción de la BC sin tejer. Preferiblemente, la celulosa sintetizada de manera bacteriológica (BC) de la presente invención es celulosa nano-estructurada producida de manera biotecnológica (BNC, de sus siglas en inglés). Los términos "*celulosa producida de manera biotecnológica*" y "*celulosa sintetizada de manera bacteriana*" se emplean de manera intercambiable en la presente memoria.

La presente invención se refiere a BC. La BC es un polisacárido extracelular producida mediante diferentes bacterias, que incluyen a las cepas *Komagatagaibacter, Agrobacter* y *Sarcina*. La BC es una celulosa que puede estar nano-estructurada. La BC nano-estructurada se denomina BNC (celulosa nano-estructurada sintetizada de manera bacteriana). En comparación con la celulosa convencional, la BC se caracteriza por varias ventajosas propiedades. En particular, tiene una fuerza de tracción, flexibilidad, y capacidad de retención de agua altas, una pronunciada permeabilidad a líquidos y gases, y una gran compatibilidad con los tejidos vivos (Sulaeva, I., Henniges, U., Rosenau, T., Potthast. A., 2015. Bacterial cellulose as material for wound treatment: Properties and modifications. A review. Biotechnology Advances 33, 1547-1571). El método de la presente invención facilita la producción de BC sin tejer. Según la presente invención, una BC sin tejer es en particular una BC de fibras sin tejer. Los términos "*BC sin tejer*" y "*BC de lana*" se pueden emplear de manera intercambiable de acuerdo con la presente invención.

Los métodos para producir celulosa bacteriana son conocidos en la técnica. Se emplean en particular, los procesos de producción estáticos o discontinuos, tales como la fermentación estática. La mayoría de la BC que se produce hoy en día se produce mediante fermentación del agua de coco en un proceso de baño estático ("*nata de coco*"). Sin embargo, la BC producida mediante los procesos de producción estáticos o discontinuos conocidos son relativamente caros, y presentan varios inconvenientes, en particular con desventajas o al menos propiedades subóptimas de la celulosa bacteriana producida. Por otra parte, los procesos de producción estáticos de la BC bacteriana están limitados por la producción de los lotes. Por ejemplo, los documentos CN 101386877 A, CN 102784071 A y US 4.655.758 A describen la producción de BC en procesos estáticos. La celulosa bacteriana producida en dichos procesos de la técnica anterior es de un peso relativamente alto y tiene la desventaja de tener una fuerza de tracción baja. Debido a la fuerza de tracción relativamente baja, los productos de BC de la técnica anterior también se desgarran fácilmente. Ninguno de los métodos estáticos o discontinuos de la técnica anterior describen que se controle la temperatura del aire sobre el cultivo bacteriano y deberá ser similar a la temperatura del medio de cultivo en el vaso de cultivo, al menos dentro de una determinada distancia desde la superficie de contacto de la BC y el aire.

Se han descrito también antes métodos para la producción semi-estática de BC sin tejer. Por ejemplo, la Patente WO 2010/028632 A2 describe un método para producir BC de una forma plana. La BC sin tejer se produce en un vaso de cultivo y la BC terminada se extrae. La BC sin tejer no acabada permanece en el vaso de cultivo hasta que la BC sin tejer alcanza el espesor deseado. La Patente WO 2010/028632 A2 describe una temperatura de cultivo de 20ºC a 32ºC y un suministro de aire de 1 a 200 l/min.

En principio, la producción semi-estática de BC sin tejer puede ser por etapas o continua. En otras palabras, la extracción de la BC del vaso de cultivo se puede realizar de una manera progresiva o de una manera continua. Especialmente, ninguno de los métodos de la técnica anterior describe que se controle la temperatura sobre el cultivo bacteriano y deberá ser similar a la temperatura del medio de cultivo en el vaso de cultivo, al menos dentro de una determinada distancia desde la superficie de contacto de la BC y el aire.

El rendimiento de la BC sin tejer es relativamente bajo en comparación con los métodos de la técnica anterior. La Patente WO 2010/028632 A2 describe que se obtiene BC sin tejer de un espesor de 0,5 a 1,6 cm solo después de 10 a 16 días de incubación.

Por otra parte, los métodos de la técnica anterior tienen la desventaja de que la BC sin tejer que se obtiene comprende una cantidad sustancial de BC pre-polimerizada. Dicho pre-polímero se tiene que eliminar antes de que la BC sin tejer se pueda utilizar. La BC pre-polimerizada consiste básicamente en un entramado muy flojo de fibras y representa, por tanto, un precursor de la BC sin tejer terminada. En los métodos de la técnica anterior, la eficacia de la producción de BC es comparativamente baja. Por lo tanto, el pre-polímero puede descender hacia fuera desde la superficie de contacto con el aire más profundo en el medio de cultivo antes de completar la producción de la BC sin tejer terminada. Sin embargo, en el medio de cultivo más interior hay niveles de oxígeno relativamente bajos en comparación con la superficie de contacto con el aire. En consecuencia, se impedirá sustancialmente la producción de BC adicional en las partes más bajas para que el material no alcance el estado de BC sin tejer terminada pero que, en cambio permanezca en el estado de pre-polímero. Debido a sus menores propiedades mecánicas, el pre-polímero flojo es desventajoso para la mayoría de los tipos de aplicaciones y, por tanto, se tiene que eliminar en una etapa de proceso adicional. Por lo tanto, sería muy ventajoso si la eficacia de la producción de BC sin tejer se incrementase de tal modo que la conversión del estado de pre-polímero al estado de BC sin tejer terminada se

completase sustancialmente antes de descender el material fuera de la superficie de contacto con el aire más profundo en el medio de cultivo.

Las Patentes WO 2010/029044 A2, DE 10 2013 001 002 A1 y EP 0 323 717 A2 describen procesos para producir celulosa sintetizada de manera bacteriana sin el control de la temperatura y humedad relativa de la atmósfera gaseosa sobre el cultivo bacteriano. La Patente WO 2010/029044 A2 describe que la atmósfera gaseosa introducida en la cámara de reacción se seca de manera intencional.

Es un objeto de la presente invención resolver el problema de la técnica anterior y proporcionar un método con un mayor rendimiento y una mayor eficacia de la producción de la BC sin tejer. También es un objeto de la presente invención proporcionar un método para producir BC sin tejer, en donde el consumo del medio de cultivo sea particularmente bajo.

Por consiguiente, es un objeto de la presente invención proporcionar además BC sin tejer, en particular BC sin tejer con excelente fuerza de tracción, en particular BC sin tejer que tiene una fuerza de tracción específica mejorada, en donde la fuerza de tracción específica indica la fuerza de tracción de una BC sin tejer dividida por el espesor de la BC sin tejer. Es también un objeto de la presente invención proporcionar particularmente BC sin tejer con una estructura de entramado homogéneo, en particular una densidad muy homogénea de la estructura del entramado, y con una estructura de la superficie particularmente homogénea.

Por otra parte, es también un objeto de la presente invención proporcionar usos de tal BC sin tejer. Es también un objeto de la presente invención proporcionar un aparato para la producción de la BC sin tejer.

El problema se resuelve mediante el objeto de estudio de las reivindicaciones de la patente. El problema se resuelve en particular mediante un método para producir BC sin tejer que comprende las etapas de

a) Sintetizar BC mediante incubación de un cultivo bacteriano en un vaso de cultivo, en donde el cultivo bacteriano comprende un medio de cultivo líquido y la bacteria que sintetiza BC,

b) Añadir opcionalmente medio de cultivo fresco o reciclado y/o eliminar el medio de cultivo consumido durante la incubación,

c) Extraer del vaso de cultivo la BC sin tejer producida que tiene un espesor medio de al menos 0,5 mm,

en donde al menos durante la etapa a), más preferiblemente al menos durante las etapas a) y b), más preferiblemente durante las etapas a) a c) la atmósfera gaseosa sobre el cultivo bacteriano se mantiene a una temperatura que es como máximo 10 K por debajo de la temperatura más alta del medio de cultivo en el vaso de cultivo dentro de una distancia de la superficie de contacto de la BC y la atmósfera gaseosa de 0 a 2 cm medidos en perpendicular a la superficie de contacto y en donde al menos durante la etapa a) la atmósfera gaseosa sobre el cultivo bacteriano se mantiene a una humedad relativa de al menos el 70% dentro de una distancia de la superficie de contacto de la BC y la atmósfera gaseosa de 0 a 2 cm medidos en perpendicular a la superficie de contacto.

Los presentes inventores encontraron que es una ventaja si la atmósfera sobre el cultivo bacteriano se mantiene a una temperatura que es como máximo 10 K por debajo de la temperatura más alta del medio de cultivo en el vaso de cultivo dentro de una distancia de la superficie de contacto de la BC y la atmósfera gaseosa de 0 a 2 cm medidos en perpendicular a la superficie de contacto. En particular, la BC sin tejer se puede obtener con un mayor rendimiento espacio/tiempo. En otras palabras, la BC sin tejer se puede obtener con una buena fuerza de tracción tras tiempos de producción comparativamente cortos en comparación con la técnica anterior. Por otra parte, en realizaciones particularmente preferidas la cantidad de pre-polímero de BC remanente unido a la BC sin tejer se puede reducir drásticamente porque la eficacia de la producción de BC sin tejer puede aumentar de tal modo que la conversión del estado de pre-polímero al estado de BC sin tejer terminada se puede completar sustancialmente antes de descender el material fuera de la superficie de contacto con el aire más profundo en el medio de cultivo. Preferiblemente, la BC sin tejer terminada de la presente invención no contiene más del 20% en peso, más preferiblemente no más del 10% en peso de material flojo de pre-polímero.

Como se describe anteriormente, el control de la temperatura de la presente invención es ventajosa en la producción de BC estática. Sin embargo, los presentes inventores encontraron que se pueden conseguir mejores resultados si el control de la temperatura de la invención se utiliza en métodos semi-estáticos de etapas progresivas o continuas. Por lo tanto, preferiblemente la síntesis de BC en el vaso de cultivo continúa durante la extracción del vaso de cultivo de la BC sin tejer que tiene un espesor medio de al menos 0,5 mm según la etapa c) del método, en donde la BC sin tejer no acabada permanece en el vaso de cultivo y se separa de la BC sin tejer que se extrae, en donde el método preferiblemente comprende las siguientes etapas:

d) Continuación de la síntesis de BC en el vaso de cultivo mediante la continuación de la incubación del cultivo bacteriano en el vaso de cultivo,

e) Añadir opcionalmente medio de cultivo fresco o reciclado y/o eliminar el medio de cultivo consumido durante la incubación continua,

f) Extraer del vaso de cultivo la BC sin tejer producida que tiene un espesor medio de al menos 0,5 mm, en donde la síntesis de BC continúa opcionalmente durante la extracción y en donde opcionalmente la BC sin tejer no acabada permanece en el vaso de cultivo y se separa de la BC sin tejer que se extrae, y

g) Opcionalmente repetir las etapas d) a f) al menos una vez.

Preferiblemente, al menos durante las etapas a) y d), más preferiblemente al menos durante las etapas a), b), d) y e), más preferiblemente durante las etapas a) a g) la atmósfera gaseosa sobre el cultivo bacteriano se mantiene a una temperatura que es como máximo 10 K por debajo de la temperatura más alta del medio de cultivo en el vaso de cultivo dentro de una distancia de la superficie de contacto de la BNC y la atmósfera gaseosa de 0 a 2 cm medidos en perpendicular a la superficie de contacto.

Según la presente invención, una temperatura de la atmósfera gaseosa de "*como máximo X K*" por debajo de la temperatura más alta del medio de cultivo indica que la temperatura de la atmósfera gaseosa no está por debajo del límite más bajo indicado. Sin embargo, esto no significa que la temperatura de la atmósfera gaseosa sea necesariamente más baja que la temperatura del medio de cultivo. Más bien, la temperatura de la atmósfera gaseosa y la temperatura del medio de cultivo pueden ser sustancialmente iguales o la temperatura de la atmósfera gaseosa puede ser incluso mayor que la temperatura del medio de cultivo.

Preferiblemente, la atmósfera de cultivo sobre el medio de cultivo se mantiene a una temperatura que es como máximo 5 K, más preferiblemente como máximo 4 K, más preferiblemente como máximo 3 K, más preferiblemente como máximo 2 K, más preferiblemente como máximo 1 K, más preferiblemente como máximo 0,5 K, más preferiblemente como máximo 0,1 K por debajo de la temperatura más alta del medio de cultivo en el vaso de cultivo dentro de una distancia de la superficie de contacto de la BC y la atmósfera gaseosa de 0 a 2 cm medidos en perpendicular a la superficie de contacto. En realizaciones particularmente preferidas, la atmósfera gaseosa sobre el cultivo bacteriano se mantiene a una temperatura que es al menos tan alta como la temperatura del medio de cultivo en el vaso de cultivo dentro de una distancia de la superficie de contacto de la BC y la atmósfera gaseosa de 0 a 2 cm medidos en perpendicular a la superficie de contacto. Preferiblemente, la atmósfera gaseosa sobre el cultivo bacteriano se mantiene a una temperatura que es como máximo 10 K, más preferiblemente como máximo 5 K, más preferiblemente como máximo 4 K, más preferiblemente como máximo 3 K, más preferiblemente como máximo 2 K, más preferiblemente como máximo 1 K, más preferiblemente como máximo 0,5 K, más preferiblemente como máximo 0,1 K por encima de la temperatura más alta del medio de cultivo en el vaso de cultivo dentro de una distancia de la superficie de contacto de la BC y la atmósfera gaseosa de 0 a 2 cm medidos en perpendicular a la superficie de contacto. Preferiblemente, la atmósfera gaseosa sobre el cultivo bacteriano se mantiene a una temperatura de como máximo ± 10 K, más preferiblemente como máximo ± 5 K, más preferiblemente como máximo ± 4 K, más preferiblemente como máximo ± 3 K, más preferiblemente como máximo ± 2 K, más preferiblemente de como máximo ± 1 K, más preferiblemente como máximo ± 0,5 K, más preferiblemente como máximo ± 0,1 K, en comparación con la temperatura del medio de cultivo en el vaso de cultivo dentro de una distancia de la superficie de contacto de la BC y la atmósfera gaseosa de 0 a 2 cm medidos en perpendicular a la superficie de contacto.

Como se describe anteriormente, una baja diferencia de temperatura entre el medio de cultivo y la atmósfera gaseosa se relaciona con un mayor rendimiento espacio-tiempo. Además, una baja diferencia de temperatura entre el medio de cultivo y la atmósfera gaseosa se relaciona con una producción de BC sin tejer con alta fuerza de tracción, en particular BC sin tejer que tiene una fuerza de tracción específica mejorada, en donde la fuerza de tracción específica indica la fuerza de tracción de una BC sin tejer dividida por el espesor de la BC sin tejer. Una baja diferencia de temperatura entre el medio de cultivo y la atmósfera gaseosa se relaciona con la producción de BC sin tejer con una estructura de entramado particularmente homogéneo, en particular con una estructura de entramado de densidad muy homogénea, y con una estructura de superficie particularmente homogénea.

Por otra parte, una baja diferencia de temperatura entre el medio de cultivo y la atmósfera gaseosa es también ventajosa por otra razón. En particular, en realizaciones en las que el vaso de cultivo se recubre con un recubrimiento, una diferencia baja de temperatura entre el medio del cultivo y la atmósfera gaseosa da como resultado una baja e incluso sustancialmente nula condensación de líquido en las superficies del recubrimiento u otras superficies que recubren el interior del vaso de cultivo. Es preferible reducir e incluso evitar dicha condensación porque de lo contrario gotas de líquido podrían caer de la superficie del recubrimiento en el vaso de cultivo y se podría de este modo alterar la producción de la BC y empeorar la calidad de la BC sin tejer producida. Por otra parte, en determinadas realizaciones de la presente invención el recubrimiento que recubre el vaso de cultivo puede ser transparente para facilitar la inspección visual y/o el análisis óptico del proceso de la producción, preferiblemente empleando técnicas de obtención de imágenes, sin la necesidad de retirar el recubrimiento. En tales realizaciones, la condensación en el recubrimiento puede alterar o impedir la inspección visual del proceso de cultivo.

Un recubrimiento que se prefiere particularmente de acuerdo con la presente invención, es una tapadera.

Preferiblemente, la atmósfera gaseosa es aire. En otras palabras, según la presente invención se prefiere que la composición gaseosa del aire alrededor del vaso de cultivo no se altere particularmente para que la atmósfera gaseosa corresponda sustancialmente a la atmósfera de la tierra, la composición de la cual se conoce por el experto en la técnica. En resumen, el aire seco contiene aproximadamente 78% volúmenes de nitrógeno, 21% volúmenes de

oxígeno y aproximadamente 1% en volumen de otros gases, en particular argón y dióxido de carbono. En realizaciones alternativas, la composición de la atmósfera gaseosa puede diferir de la composición del aire.

Según la presente invención, la BC sin tejer se produce preferiblemente en un proceso de etapas progresivas o semi-estático continuo. Un proceso "*en etapas progresivas o semi-estático continuo*" como se emplea en la presente memoria, se refiere preferiblemente a un método en el que la BC se produce de un cultivo bacteriano en un medio de cultivo, que se agita, sacude, o se remueve activamente de otro modo durante la síntesis de la BC, en el que, sin embargo, la BC se produce de manera continua por el cultivo bacteriano. El hecho de que el medio de cultivo no se agite, sacuda, o se remueva activamente de otro modo durante la síntesis de la BC no excluye el cultivo o la extracción de la BC del cultivo bacteriano y/o del vaso de cultivo durante la síntesis de BC ni de la adición de medio de cultivo y/o constituyentes del medio de cultivo durante la biosíntesis de BC. Particularmente, en un proceso "*en etapas progresivas o semi-estático continuo*" como se emplea en la presente memoria, la BC se cultiva o extrae del cultivo bacteriano y/o del vaso de cultivo más de una vez durante la síntesis de BC, preferiblemente de forma regular, en etapas progresivas o de manera continua. Particularmente, en un proceso "*en etapas progresiva o semi-estático*" como se emplea en la presente memoria, el medio de cultivo y/o los constituyentes del medio de cultivo se añaden preferiblemente más de una vez, preferiblemente de forma regular, en etapas progresivas y/o de manera continua durante la síntesis de BC. Al respecto con el proceso "en etapas progresivas o semi-estático" como se emplea en la presente memoria, preferiblemente no es un método de producción de lotes.

Preferiblemente, en una realización de la presente invención, se cultiva o extrae una media de al menos 0,125 $m^2$ de BC sin tejer, más preferiblemente al menos 0,25 $m^2$ de BC sin tejer, más preferiblemente al menos 0,5 $m^2$ de BC sin tejer, más preferiblemente 1 $m^2$ de BC sin tejer del cultivo bacteriano y/o del vaso de cultivo por día y por área basal de 1 $m^2$ del vaso de cultivo, preferiblemente de forma regular, en etapas progresivas y/o de manera continua (fase de recogida), después una fase inicial de generación de lana de BC sin tejer de manera mecánica (fase de incubación). Que se cultive una cantidad media de X $m^2$ de BC sin tejer por día y por un área basal de 1 $m^2$ de vaso de cultivo no significa necesariamente que la recogida se realice a diario. Por ejemplo, la recogida se podría realizar cada dos días y la cantidad media de BC sin tejer que se recoge por día se puede determinar mediante la división de la cantidad de BC sin tejer que se cultiva (en $m^2$ por $m^2$ de área basal de vaso de cultivo) por el número de días de cultivo (2 días en este ejemplo).

Según la etapa a) del método de la presente invención, la BC se sintetiza mediante la incubación de un cultivo bacteriano en un vaso de cultivo, en donde el cultivo bacteriano comprende medio de cultivo líquido y bacterias que sintetizan BC.

En general, en la presente invención se puede aplicar cualquier cepa bacteriana que sintetiza BC. Sin embargo, las bacterias que sintetizan BC son preferiblemente de la cepa *Komagatagaibacter xylinum*, también conocida como *Gluconacetobacter xylinum*. Preferiblemente, la cepa *K. xylinum* se selecciona del grupo que consiste en las cepas ATCC 11142 y DSM 14666. En realizaciones preferidas, el cultivo bacteriano puede comprender una mezcla de dos cepas bacterianas o incluso tres cepas bacterianas. En una realización preferida, el cultivo bacteriano comprende una mezcla de cepas *K. xylinum* ATCC 11142 y DSM 14666.

Preferiblemente, el medio de cultivo comprende una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno y una fuente de vitaminas y opcionalmente un sistema tampón. Preferiblemente, el medio de cultivo es una disolución acuosa. Preferiblemente, el medio de cultivo consiste sustancialmente en una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno y una fuente de vitaminas, un sistema tampón opcional y agua.

El término "*fuente de carbono*" se refiere a carbono que contiene componentes que se pueden utilizar, en particular metabolizar, por las bacterias. El término "*fuente de nitrógeno*" se refiere a nitrógeno que contiene componentes que se pueden utilizar, en particular metabolizar, por las bacterias. El término "*fuente de vitaminas*" se refiere a vitaminas que contienen componentes que se pueden utilizar por las bacterias. El término "*sistema tampón*" se refiere a componentes que son útiles para minimizar cambios del pH del medio de cultivo. Preferiblemente, la fuente de carbono se selecciona de uno o más azúcares y de sus derivados. Preferiblemente, la fuente de nitrógeno es peptona. Preferiblemente, la fuente de vitaminas es extracto de levadura. Preferiblemente, el sistema tampón es fosfato disódico de hidrógeno y ácido cítrico.

Preferiblemente, el medio de cultivo comprende la fuente de carbono en una cantidad de al menos 10 g/l, más preferiblemente al menos 15 g/l en base al volumen del medio de cultivo. Preferiblemente, el medio de cultivo comprende la fuente de carbono en una cantidad de como máximo 50 g/l, más preferiblemente como máximo 30 g/l en base al volumen del medio de cultivo. En particular preferiblemente, el medio de cultivo comprende la fuente de carbono en una cantidad de aproximadamente 20 g/l.

Preferiblemente, el medio de cultivo comprende la fuente de nitrógeno en una cantidad de al menos 2 g/l, más preferiblemente al menos 4 g/l en base al volumen del medio de cultivo. Preferiblemente, el medio de cultivo comprende la fuente de nitrógeno en una cantidad de como máximo 10 g/l, más preferiblemente como máximo 7 g/l en base del volumen del medio de cultivo. En particular preferiblemente, el medio de cultivo comprende la fuente de nitrógeno en una cantidad de aproximadamente 5 g/l.

Preferiblemente el medio de cultivo comprende la fuente de vitaminas en una cantidad de al menos 2 g/l, más preferiblemente al menos 4 g/l en base al volumen del medio de cultivo. Preferiblemente, el medio de cultivo comprende la fuente de vitaminas en una cantidad de como máximo 10 g/l, más preferiblemente como máximo 7 g/l en base del volumen del medio de cultivo. En particular preferiblemente, el medio de cultivo comprende la fuente de vitaminas en una cantidad de aproximadamente 5 g/l.

Preferiblemente el medio de cultivo comprende el sistema tampón en una cantidad de al menos 2 g/l, más preferiblemente al menos 3 g/l en base al volumen del medio de cultivo. Preferiblemente, el medio de cultivo comprende el sistema tampón en una cantidad de como máximo 10 g/l, más preferiblemente como máximo 5 g/l en base del volumen del medio de cultivo. En particular preferiblemente, el medio de cultivo comprende el sistema tampón en una cantidad de aproximadamente 3,8 g/l.

En particular preferiblemente, el medio de cultivo comprende 20 g/l glucosa, 5 g/l de peptona, 5 g/l de extracto de levadura, 2,7 g/l de fosfato disódico de hidrógeno y 1,15 g/l de ácido cítrico.

Opcionalmente, el medio de cultivo se puede enriquecer mediante aditivos, tales como componentes orgánicos, por ejemplo, almidón, chitosán, quitina, colágeno, metilcelulosa, carboximetilcelulosa, ácido hialurónico y/o alginatos, hidroxietilcelulosa, polivinilalcohol y/o polietilenóxido, o componentes inorgánicos, por ejemplo, óxidos metálicos, hidroxiapatita y/o grafeno. En particular, tales aditivos se pueden emplear de acuerdo con la presente invención para alterar la estructura de red y/o propiedades materiales y/o para producir compuestos de BC. El término "*BC sin tejer*" como se emplea en la presente memoria comprende tal BC sin tejer con estructura en red alterada y/o propiedades materiales, así como tales compuestos de BC.

Preferiblemente, el volumen de cultivo es de al menos 5 l, más preferiblemente al menos 50 l, aún más preferiblemente al menos 200 l, aún más preferiblemente al menos 400 l, y aún más preferiblemente al menos 1000 l. Preferiblemente, el volumen de cultivo es como máximo 20000, más preferiblemente como máximo 18000, más preferiblemente como máximo 10000 l, y aún más preferiblemente como máximo 5000 l. Particularmente, el proceso en etapas o semi-estático continuo como se describe en la presente memoria puede permitir volúmenes de cultivo muy ventajosos.

Los presentes inventores encontraron que el volumen del medio de cultivo por área basal del vaso de cultivo también es un factor que tiene influencia en la eficacia del proceso de la invención. Si la proporción respectiva es muy alta, es más difícil mantener las condiciones de cultivo constantes por lo que existe un riesgo de que el material obtenido sea menos homogéneo. Por otro lado, si hay muy poco medio de cultivo por área basal del vaso de cultivo, la BC puede no obtenerse con el espesor deseado. Preferiblemente, la proporción del volumen del medio de cultivo por área basal del vaso de cultivo es de 1 a 30 $l/m^2$, más preferiblemente de 2 a 20 $l/m^2$, más preferiblemente de 3 a 10 $l/m^2$.

En realizaciones preferidas, el método de la presente invención permite la reducción del consumo del medio de cultivo. Con el método de la presente invención, particularmente en realizaciones en las que el medio de cultivo se recubre con una tapa, la evaporación del medio de cultivo se puede reducir fuertemente o incluso evitarse. Por lo tanto, la cantidad del medio de cultivo que se tiene que reemplazar se puede limitar sustancialmente a la cantidad del medio de cultivo que se elimina del vaso de cultivo mediante la extracción de la BC. Como se describe con más detalle a continuación, la BC sin tejer de la presente invención comprende grandes cantidades de líquido en su estado natural. Por tanto, cuando la BC sin tejer se elimina del vaso de cultivo, también se elimina el medio de cultivo contenido dentro de la BC sin tejer del vaso de cultivo. Este medio de cultivo se reemplaza preferiblemente mediante la adición al vaso de cultivo de medio de cultivo fresco o reciclado. Sin embargo, el método de la presente invención permite reducir otras pérdidas de medio de cultivo, como por ejemplo, mediante evaporación para que la pérdida general del medio de cultivo se reduzca fuertemente.

Además, cabe señalar que la reducción de la evaporación también es ventajosa por otra razón. Concretamente, la evaporación se relaciona normalmente con un cambio de concentraciones de diferentes componentes del medio de cultivo. En particular, las concentraciones de la fuente de carbono, la fuente de nitrógeno, la fuente de vitaminas y el sistema tampón opcional generalmente aumenta en caso de evaporación porque se evapora el agua principalmente. En casos de evaporación sustancial, la concentración del medio de cultivo que se puede añadir opcionalmente al vaso de cultivo según las etapas b) y e) del método de la presente invención se debe adaptar para compensar los cambios de concentración causados por la evaporación. Esto puede requerir mediciones y cálculos complicados. Sin embargo, el método de la presente invención que reduce preferiblemente la evaporación de forma drástica, permite la adición de medio de cultivo en las etapas b) y e) sin la necesidad de ninguna adaptación de las concentraciones de los componentes.

Preferiblemente, la evaporación del medio de cultivo del vaso de cultivo es como máximo 2,0 L por $m^2$ de vaso de cultivo por día, más preferiblemente como máximo 1,0 L por $m^2$ de vaso de cultivo por día, más preferiblemente como máximo 0,5 L por $m^2$ de vaso de cultivo por día, más preferiblemente como máximo 0,2 L por $m^2$ de vaso de cultivo por día, más preferiblemente como máximo 0,1 L por $m^2$ de vaso de cultivo por día, más preferiblemente como máximo 0,05 L por $m^2$ de vaso de cultivo por día, más preferiblemente como máximo 0,02 L por $m^2$ de vaso de

cultivo por día, más preferiblemente como máximo 0,01 L por $m^2$ de vaso de cultivo por día. Preferiblemente, la evaporación se mide bajo condiciones de flujo de aire laminar y a una temperatura de 28ºC.

Los volúmenes de cultivo pueden depender también del área de síntesis de la BC deseada, y viceversa. Las propiedades del contenido del producto de BC obtenido también pueden estar influidas por el vaso de cultivo y/o por el área de síntesis. Preferiblemente, el vaso de cultivo tiene un área de síntesis de al menos 1 $cm^2$, más preferiblemente al menos 10 $cm^2$, más preferiblemente al menos 100 $cm^2$, más preferiblemente al menos 1000 $cm^2$, aún más preferiblemente al menos 1 $m^2$ y aún más preferiblemente al menos 10 $m^2$. Preferiblemente, el vaso de cultivo tiene un área de síntesis de como máximo 50000 $m^2$, más preferiblemente como máximo 20000 $m^2$, más preferiblemente como máximo 1000 $m^2$, aún más preferiblemente como máximo 100 $m^2$, aún más preferiblemente como máximo 50 $m^2$. Particularmente, el proceso continuo semi-estático como se describe en la presente memoria puede facilitar un área de síntesis muy ventajosa.

Preferiblemente, el vaso de cultivo tiene una forma sustancialmente rectangular. Preferiblemente, el aspecto de la proporción de la longitud a la anchura del vaso de cultivo es de al menos 1,5. Más preferiblemente, el aspecto de la proporción de la longitud a la anchura del vaso de cultivo es de al menos 2, más preferiblemente al menos 3, más preferiblemente al menos 5, más preferiblemente al menos 10, más preferiblemente al menos 15, más preferiblemente al menos 20, más preferiblemente al menos 25, más preferiblemente al menos 30, más preferiblemente al menos 50, más preferiblemente al menos 100. Sin embargo, el aspecto respectivo a la proporción no debe ser muy grande. Preferiblemente que el aspecto de la proporción de la longitud a la anchura del vaso de cultivo sea como máximo 10000, más preferiblemente como máximo 8000, más preferiblemente como máximo 5000, más preferiblemente como máximo 2000, más preferiblemente como máximo 1000, más preferiblemente como máximo 500. Los inventores encontraron que tales aspectos de las proporciones son ventajosos particularmente para la eficacia del método de la presente invención.

Preferiblemente, el vaso de cultivo tiene una longitud de al menos 100 cm, más preferiblemente al menos 200 cm, más preferiblemente al menos 500 cm, más preferiblemente al menos 1000. Preferiblemente, el vaso de cultivo tiene una longitud de cómo máximo 1000 m, más preferiblemente como máximo 200 m, más preferiblemente como máximo 100, más preferiblemente como máximo 50 m, más preferiblemente como máximo 20 m.

Preferiblemente, el vaso de cultivo tiene una anchura de al menos 10 cm, más preferiblemente al menos 20 cm, más preferiblemente al menos 50 cm, más preferiblemente al menos 100 cm. Preferiblemente, el vaso de cultivo tiene una anchura de como máximo 100 m, más preferiblemente como máximo 20 m, más preferiblemente como máximo 10 m, más preferiblemente como máximo 5 m, más preferiblemente como máximo 2 m.

Preferiblemente, la temperatura del medio de cultivo en la etapa a) del método de la presente invención es al menos 20ºC, más preferiblemente al menos 25ºC, más preferiblemente al menos 28ºC. Si la temperatura de incubación es demasiado baja, las cepas bacterianas no crecen de forma adecuada. Preferiblemente, la temperatura del medio de cultivo en la etapa a) del método de la presente invención es como máximo 40ºC, más preferiblemente como máximo 35ºC, más preferiblemente como máximo 30ºC. Si la temperatura de incubación es demasiado alta, las cepas bacterianas no crecen de forma adecuada. Preferiblemente, la temperatura del medio de cultivo se controla mediante mediciones adecuadas, como por ejemplo un dispositivo calentador.

Preferiblemente, la temperatura del medio de cultivo es muy homogénea a lo largo del vaso de cultivo. Esto es ventajoso para obtener BC sin tejer con una alta eficacia. Además, se incrementa la homogeneidad de la BC sin tejer obtenida. Preferiblemente, la diferencia de temperatura entre la temperatura más alta y la más baja del medio de cultivo en el vaso de cultivo es como máximo 3 K, más preferiblemente como máximo 2 K, más preferiblemente como máximo 1,5 K, más preferiblemente como máximo 1 K, más preferiblemente como máximo 0,5 K, más preferiblemente como máximo 0,2 K, más preferiblemente como máximo 0,1 K. Si la diferencia de temperatura es demasiado alta, la homogeneidad de la BC sin tejer obtenida es deficiente.

Preferiblemente el tiempo de incubación en la etapa a) del método de la presente invención es de al menos 1 día, más preferiblemente al menos 2 días, más preferiblemente al menos 3 días. Si el tiempo de incubación es demasiado corto, no se produce celulosa lo suficiente estable de manera mecánica. Preferiblemente, el tiempo de incubación es como máximo 10 días, más preferiblemente como máximo 9 días, más preferiblemente como máximo 8 días, más preferiblemente como máximo 7 días, más preferiblemente como máximo 6 días. En particular preferiblemente, el tiempo de incubación en la etapa a) del método de la presente invención es de 3 a 6 días.

Opcionalmente, según la etapa b) del método de la presente invención se puede añadir medio de cultivo fresco o reciclado y/o se puede eliminar el medio de cultivo consumido durante la incubación. El medio de cultivo reciclado se puede obtener del medio de cultivo consumido mediante la adición al medio de cultivo consumido de constituyentes cuyos contenidos se reducen en el medio de cultivo consumido en comparación con el medio de cultivo original.

Preferiblemente, el medio de cultivo fresco o reciclado se añade encima o debajo del nivel de fluido del medio de cultivo en el vaso de cultivo. Preferiblemente en particular, el medio de cultivo fresco o reciclado se añade debajo del nivel de fluido del medio de cultivo en el vaso de cultivo. Esto es ventajoso para minimizar la alteración del cultivo bacteriano y para minimizar los cambios estructurales de la BC sin tejer que podría aparecer en caso contrario.

Los constituyentes del medio de cultivo se consumen durante la incubación del cultivo bacteriano según la etapa a) del método de la presente invención. En otras palabras, el medio de cultivo consumido se forma durante la incubación. Por lo tanto, es una ventaja si el medio de cultivo es fresco o al menos los constituyentes de los mismos se añaden durante la incubación del cultivo bacteriano para mantener el contenido de los constituyentes relevantes del medio de cultivo en un nivel sustancialmente constante. En particular, es ventajoso si los niveles de la fuente de carbono, la fuente de nitrógeno, la fuente de vitaminas y/o los componentes del sistema tampón opcional se mantienen sustancialmente constantes. El término "*sustancialmente constante*" indica que las concentraciones se mantienen preferiblemente en un intervalo que es suficiente para el cultivo adecuado de las bacterias que sintetizan BC. Preferiblemente, el término "*sustancialmente constante*" indica que las concentraciones se mantienen preferiblemente constantes en un intervalo del 20% al 150%, más preferiblemente del 30% al 100%, más preferiblemente del 35% al 80%, más preferiblemente del 40% al 60% de las concentraciones iniciales al inicio de la incubación en la etapa a) del método de la presente invención.

Es preferible que el medio de cultivo fresco que se añade opcionalmente según la etapa b) del método de la presente invención tenga una composición similar a la del medio de cultivo al inicio de la incubación en la etapa a) del método de la presente invención como se describe anteriormente. Más preferiblemente, el medio de cultivo fresco tiene sustancialmente la misma composición a la del medio de cultivo al inicio de la incubación en la etapa a) del método de la presente invención.

Preferiblemente, el medio de cultivo fresco o reciclado que se añade según la etapa b) tiene una temperatura que difiere de la temperatura del medio de cultivo pre-existente en el vaso de cultivo mediante como máximo ± 25 K, más preferiblemente como máximo ± 10 K, más preferiblemente como máximo ± 8 K, más preferiblemente como máximo ±5 K, más preferiblemente como máximo ± 2 K, más preferiblemente como máximo ± 1 K.

Además, durante la incubación del cultivo bacteriano la bacteria que sintetiza BC puede producir metabolitos que alteran potencialmente las condiciones del cultivo. Por lo tanto, es conveniente que el medio de cultivo se elimine durante la incubación.

Preferiblemente en particular, el medio de cultivo fresco se añade y el medio de cultivo consumido se elimina durante la incubación. De ese modo, las ventajas descritas anteriormente de añadir medio de cultivo fresco y eliminar el medio de cultivo consumido se puede conseguir y además, el volumen del cultivo se puede mantener a un nivel sustancialmente constante.

Según la etapa c) del método de la presente invención, la BC sin tejer producida que tiene un espesor medio de al menos 0,5 mm se extrae del vaso de cultivo. Un espesor medio de al menos 0,5 mm indica que la producción de BC sin tejer ha finalizado. El espesor de la BC sin tejer extraída no deberá ser demasiado alto. En particular, un espesor bajo es ventajoso para una variedad de usos de la BC. Preferiblemente, el espesor medio de la BC extraída es como máximo 30 mm, más preferiblemente como máximo 20 mm, más preferiblemente como máximo 10 mm, más preferiblemente como máximo 5 mm, más preferiblemente como máximo 4 mm, más preferiblemente como máximo 3 mm. La presente invención encontró que el método de la presente invención facilita sorprendentemente la obtención de BC sin tejer estable de manera mecánica con un espesor particularmente bajo. En particular preferiblemente, el espesor medio de la BC sin tejer extraída es de 0,5 a 4 mm.

Los inventores encontraron que mediante el método de la presente invención la BC sin tejer se puede obtener con un aumento del rendimiento espacio-tiempo. En otras palabras, se puede obtener BC sin tejer con buena fuerza de tracción después de tiempos de producción comparablemente cortos en comparación con la técnica anterior. Además, la BC sin tejer de la presente invención tiene una fuerza de tracción específica mejorada determinada como la proporción de la fuerza de tracción y el espesor medio de la BC sin tejer. En otras palabras, la BC sin tejer de la presente invención tiene una fuerza de tracción alta incluso si el espesor de la BC sin tejer es comparativamente bajo. Esto es una ventaja para muchas aplicaciones, en particular si la BC sin tejer se va a aplicar sobre la piel, por ejemplo, como vendaje para heridas o almohadilla cosmética, particularmente como almohadilla para los ojos, mascarilla frontal, máscara de ojos, máscara de cara, o similar. Tales productos deben ser delgados comparativamente para facilitar la fijación de los productos a la piel sólo mediante medios de fuerzas adhesivas entre el producto y la piel. Los productos gruesos pueden requerir de medios de fijación adicionales debido a que son más pesados por lo que las fuerzas entre el producto y la piel pueden ser demasiado pequeñas como para compensar las fuerzas gravitacionales.

La síntesis de BC en el vaso de cultivo continúa durante la extracción de la BC sin tejer producida y la BC sin tejer no acabada permanece en el vaso de cultivo y se separa de la BC sin tejer que se extrae. El término "*BC sin tejer no acabada*" indica que aún no se ha alcanzado el espesor medio deseado.

Preferiblemente, la BC sin tejer producida se extrae del medio del vaso de cultivo en la etapa c) mediante arrastre y/o presión de la BC sin tejer fuera del vaso de cultivo en una dirección sustancialmente paralela hacia la superficie de contacto de la BC y la atmósfera gaseosa. Esta forma de extracción es ventajosa para minimizar la alteración del cultivo bacteriano y para minimizar los cambios estructurales de la BC sin tejer que podrían aparecer en caso contrario. En particular, se pueden minimizar cambios estructurales del entramado de BC o incluso evitar mediante esta forma de extracción.

Preferiblemente, la extracción de la BC sin tejer producida en la etapa c) tiene lugar después de al menos 1 día, más preferiblemente al menos 2 días, más preferiblemente al menos 3 días de incubación. Si el tiempo de incubación es demasiado corto, se produce celulosa que no es suficientemente estable de manera mecánica. Preferiblemente, la extracción de la BC sin tejer producida en la etapa c) tiene lugar después de cómo máximo 10 días, más preferiblemente como máximo 9 días, más preferiblemente como máximo 8 días, más preferiblemente como máximo 7 días, más preferiblemente como máximo 6 días de incubación. Preferiblemente, la extracción de la BC sin tejer en la etapa c) tiene lugar después de 3 a 6 días de incubación.

Preferiblemente, la separación de BC sin tejer no acabada que permanece en el vaso de cultivo y la BC sin tejer producida que se extrae del vaso de cultivo se realiza mediante corte. Preferiblemente, la separación de BC sin tejer no acabada que permanece en el vaso de cultivo y el BC sin tejer producida que se extrae del vaso de cultivo se realiza mediante un chorro de fluido de corte, en particular mediante un fluido de corte. El fluido de corte es ventajoso para obtener bordes de corte con superficie particularmente lisa. El chorro de fluido se proporciona preferiblemente con una presión de al menos 1000 y como máximo 4000 bar. El chorro de fluido preferiblemente tiene un diámetro de 100 µm a 300 µm, más preferiblemente de 125 a 200 µm, lo más preferiblemente de aproximadamente 150 µm. Los presentes inventores descubrieron que una velocidad de corte también es ventajosa para mejorar los resultados. Preferiblemente, la velocidad de corte es de al menos 0,05 cm/s, más preferiblemente al menos 0,1 cm/s, más preferiblemente al menos 0,2 cm/s, más preferiblemente al menos 0,5 cm/s, más preferiblemente al menos 1,0 cm/s. Preferiblemente, la velocidad de corte es como máximo 30 cm/s, más preferiblemente como máximo 20 cm/s, más preferiblemente como máximo 10 cm/s. Particularmente preferible, la velocidad de corte es de 0,05 cm/s a 30/cm/s, más preferiblemente de 1 cm/s a 10 cm/s. Dicho corte con un chorro de fluido es ventajoso en comparación con los métodos de corte proporcionados normalmente en la técnica, por ejemplo, el corte térmico con un láser o similar, o el corte mecánico. Tales métodos de la técnica anterior comprenden normalmente la estructura del material BNC. El corte según la presente invención, sin embargo, proporciona una alta calidad del borde de corte sin la destrucción del BNC circundante. La Figura 1 muestra imágenes de microscopio electrónico de barrido que permiten la comparación de los bordes de corte obtenidos mediante el fluido de corte con bordes de corte obtenidos mediante el corte con un bisturí. Se puede ver que la superficie del borde de corte obtenido por el fluido de corte es particularmente liso, en particular más liso que la superficie del borde de corte obtenido mediante el corte con un bisturí.

La presente invención se refiere también al uso del fluido de corte para cortar BC.

Además de las etapas a) a c), el método de la invención comprende preferiblemente otras etapas, en particular etapas d) a g) como se describe anteriormente.

Según la etapa d) del método de la presente invención, la síntesis de BC se continúa en el vaso de cultivo mediante continuación de la incubación del cultivo bacteriano en el vaso de cultivo.

Preferiblemente, la temperatura del medio de cultivo en la etapa d) del método de la presente invención es de al menos 20ºC, más preferiblemente al menos 25ºC, más preferiblemente al menos 28ºC. Si la temperatura de incubación es demasiado baja, las cepas bacterianas no crecen adecuadamente. Preferiblemente, la temperatura del medio de cultivo en la etapa d) del método de la presente invención es como máximo 40ºC, más preferiblemente como máximo 35ºC, más preferiblemente como máximo 30ºC. Si la temperatura de incubación es demasiado alta, las cepas bacterianas no crecen adecuadamente. Preferiblemente, la temperatura del medio de cultivo se controla mediante mediciones adecuadas, como por ejemplo, un dispositivo calentador. Particularmente preferible, la temperatura del medio de cultivo se controla mediante un sistema de control de la temperatura que comprende un dispositivo calentador y al menos un sensor de temperatura.

Preferiblemente el tiempo de incubación en la etapa d) del método de la presente invención es de al menos 12 horas, más preferiblemente al menos 24 horas, más preferiblemente al menos 36 horas, más preferiblemente al menos 48 horas antes del comienzo de la etapa f. Si el tiempo de incubación es demasiado corto, no se produce suficiente celulosa. Preferiblemente, el tiempo de incubación en la etapa d) es como máximo 100 horas, más preferiblemente como máximo 90 horas, más preferiblemente como máximo 80 horas, más preferiblemente como máximo 70 horas, más preferiblemente como máximo 60 horas antes del comienzo de la etapa f. Si el tiempo de incubación es demasiado largo, el espesor de la BC sin tejer producida será muy grande lo que es una desventaja para varias aplicaciones, en particular si la BC sin tejer se va a aplicar sobre la piel, por ejemplo, como un vendaje para heridas o como una almohadilla cosmética. Además, un tiempo de incubación largo vuelve al método ineficaz.

Opcionalmente, según la etapa e) del método de la presente invención se puede añadir medio de cultivo fresco o reciclado y/o el medio de cultivo consumido se puede eliminar durante incubación continua. El medio de cultivo reciclado se puede obtener del medio de cultivo consumido mediante adición al medio de cultivo consumido de constituyentes cuyos contenidos se reducen en el medio de cultivo consumido en comparación con el medio de cultivo original.

Preferiblemente, el medio de cultivo fresco o reciclado se añade por encima o por debajo del nivel de fluido del medio de cultivo en el vaso de cultivo. Preferiblemente en particular, el medio de cultivo fresco o reciclado se añade por debajo del nivel de fluido del medio de cultivo en el vaso de cultivo. Esto es ventajoso para minimizar la

alteración del cultivo bacteriano y para minimizar cambios estructurales de la BC sin tejer que podría aparecer en caso contrario.

Los constituyentes del medio de cultivo se consumen durante la incubación del cultivo bacteriano según la etapa d) del método de la presente invención. Por lo tanto, es una ventaja si el medio de cultivo fresco o al menos los constituyentes del mismo se añaden durante la incubación del cultivo bacteriano para mantener el contenido de los constituyentes relevantes del medio de cultivo en un nivel sustancialmente constante. En particular, es ventajoso si los niveles de la fuente de carbono, la fuente de nitrógeno, la fuente de vitaminas y/o los componentes del sistema tampón opcional se mantienen sustancialmente constantes. El término "*sustancialmente constante*" indica que las concentraciones se mantienen preferiblemente en un intervalo que es suficiente para el cultivo continuo adecuado de las bacterias que sintetizan BC. Preferiblemente, el término "*sustancialmente constante*" indica que las concentraciones se mantienen constantes en un intervalo del 20% al 150%, más preferiblemente del 30% al 100%, más preferiblemente del 35% al 80%, más preferiblemente del 40% al 60% de las concentraciones iniciales al inicio de la de incubación en la etapa a) del método de la presente invención.

Es preferible que el medio de cultivo fresco que se añade opcionalmente según la etapa e) del método de la presente invención tenga una composición similar a la del medio de cultivo al inicio de la incubación en la etapa d) del método de la presente invención como se describe anteriormente. Más preferiblemente, el medio de cultivo fresco tiene sustancialmente la misma composición a la del medio de cultivo al inicio de la incubación en la etapa d) del método de la presente invención.

Preferiblemente, el medio de cultivo fresco o reciclado que se añade según la etapa e) tiene una temperatura que difiere de la temperatura del medio de cultivo del medio de cultivo pre-existente en el vaso de cultivo mediante como máximo ± 25 K, más preferiblemente como máximo ± 10 K, más preferiblemente como máximo ± 8 K, más preferiblemente como máximo ±5 K, más preferiblemente como máximo ± 2 K, más preferiblemente como máximo ± 1 K.

Además, durante la incubación del cultivo bacteriano la bacteria que sintetiza BC puede producir metabolitos que alteran potencialmente las condiciones del cultivo. Por lo tanto, es conveniente que el medio de cultivo se elimine durante la incubación continua.

Preferiblemente en particular, el medio de cultivo fresco se añade y el medio de cultivo consumido se elimina durante la incubación. De ese modo, se pueden conseguir las ventajas descritas anteriormente de añadir medio de cultivo fresco y eliminar el medio de cultivo consumido y, además, el volumen de cultivo se puede mantener a un nivel sustancialmente constante.

Según la etapa f) del método de la presente invención, la BC sin tejer producida que tiene un espesor medio de al menos 0,5 mm se extrae del vaso de cultivo. Un espesor medio al menos 0,5 mm indica que la producción de BC sin tejer ha acabado. El espesor medio de la BC sin tejer extraída no deberá ser demasiado alto. En particular, un espesor bajo es ventajoso para una variedad de usos de la BC. Preferiblemente, el espesor medio de la BC extraída es como máximo 30 mm, más preferiblemente como máximo 20 mm, más preferiblemente como máximo 10 mm, más preferiblemente como máximo 5 mm, más preferiblemente como máximo 4 mm. Los presentes inventores descubrieron que el método de la presente invención facilita sorprendentemente la obtención de BC sin tejer estable de manera mecánica con un espesor particularmente bajo. Preferiblemente en particular, el espesor medio de la BC sin tejer extraída es de 0,5 a 4 mm.

Los inventores descubrieron que mediante el método de la presente invención la BC sin tejer se puede obtener con un aumento del rendimiento espacio-tiempo. En otras palabras, se puede obtener BC sin tejer con buena fuerza de tracción después de tiempos de producción comparablemente cortos en comparación con la técnica anterior. Además, la BC sin tejer de la presente invención tiene una fuerza de tracción específica mejorada determinada como la proporción de la fuerza de tracción y el espesor medio de la BC sin tejer.

Preferiblemente, la síntesis de BC en el vaso de cultivo continúa durante la extracción de la BC sin tejer producida y preferiblemente la BC sin tejer no acabada permanece en el vaso de cultivo y se separa de la BC sin tejer que se elimina.

Preferiblemente, la BC sin tejer producida se extrae del medio del vaso de cultivo en la etapa f) mediante arrastre y/o presión de la BC sin tejer fuera del vaso de cultivo en una dirección sustancialmente paralela a la superficie de contacto de la BC y la atmósfera gaseosa. Esta forma de extracción es ventajosa para minimizar la alteración del cultivo bacteriano y para minimizar los cambios estructurales de la BC sin tejer que podrían aparecer en caso contrario. En particular, se pueden minimizar cambios estructurales del entramado de BC o incluso evitar mediante esta forma de extracción.

Preferiblemente, la extracción de la BC sin tejer producida en la etapa f) tiene lugar después de al menos 12 horas, más preferiblemente al menos 24 horas, más preferiblemente al menos 36 horas, más preferiblemente al menos 48 horas de incubación continua según la etapa d) del método de la presente invención. Si el tiempo de incubación es demasiado corto, no se produce suficiente celulosa. Preferiblemente, el tiempo de extracción de la BC sin tejer producida en la etapa f) tiene lugar después de como máximo 100 horas, más preferiblemente como máximo 90

horas, más preferiblemente como máximo 80 horas, más preferiblemente como máximo 70 horas, más preferiblemente como máximo 60 horas de incubación continua.

Preferiblemente, la separación de BC sin tejer no acabada que permanece en el vaso de cultivo y la BC sin tejer producida que se extrae del vaso de cultivo se realiza mediante corte. Preferiblemente, la separación de BC sin tejer no acabada que permanece en el vaso de cultivo y la BC sin tejer producida que se extrae del vaso de cultivo se realiza mediante un chorro de fluido de corte, en particular mediante un fluido de corte. El fluido de corte es ventajoso para obtener bordes de corte con superficie particularmente lisa. La Figura 1 muestra imágenes de microscopio electrónico de barrido que permiten la comparación de los bordes de corte obtenidos mediante el fluido de corte con los bordes de corte obtenidos mediante el corte con un bisturí. Se puede ver que la superficie del borde de corte obtenido por el fluido de corte es particularmente liso, en particular más liso que la superficie del borde de corte obtenido mediante el corte con un bisturí.

Preferiblemente, las etapas d) a f) del método de la presente invención se repiten al menos una vez. Más preferiblemente, las etapas d) a f) se repiten al menos dos veces, más preferiblemente al menos tres veces, más preferiblemente al menos cuatro veces, más preferiblemente al menos cinco veces, más preferiblemente al menos diez veces, más preferiblemente al menos veinticinco veces. Sin embargo, las etapas d) a f) no se deben repetir extremadamente a menudo. Preferiblemente, las etapas d) a f) se repiten como máximo cien veces, más preferiblemente como máximo cincuenta veces.

Preferiblemente el periodo de tiempo desde el comienzo de la síntesis de BC sin tejer según la etapa a) hasta la finalización de la última repetición según la etapa g) es de 1 a 12 meses, más preferiblemente de 2 a 6 meses, más preferiblemente de 3 a 5 meses.

Según el método de la presente invención, preferiblemente al menos durante las etapas a) y d), más preferiblemente al menos durante las etapas a), b), d) y e), más preferiblemente durante las etapas a) a g), la atmósfera gaseosa sobre el cultivo bacteriano se mantiene a una temperatura que es como máximo 10 K por debajo de la temperatura más alta del medio de cultivo en el vaso de cultivo dentro de una distancia de la superficie de contacto de la BC y la atmósfera gaseosa de 0 a 2 cm medidos en perpendicular a la superficie de contacto. Los presentes inventores descubrieron que el control de la temperatura de la atmósfera gaseosa en el intervalo indicado contribuye a aumentar la eficacia de la producción de BC sin tejer. En particular, se puede reducir sustancialmente el tiempo de incubación necesario para obtener BC sin tejer que tiene un espesor medio de al menos 0,5 mm.

El control de la temperatura de la atmósfera gaseosa se puede conseguir mediante una variedad de mediciones diferentes según la presente invención. En realizaciones preferidas, el vaso de cultivo se recubre con una tapa. Alternativa o adicionalmente, la atmósfera gaseosa sobre el vaso de cultivo se calienta selectivamente. Es posible también mantener la atmósfera gaseosa de la habitación entera en la que se coloca el vaso de cultivo a una temperatura deseada. Por otra parte, el control de la temperatura se puede aplicar a varios vasos de cultivo, en particular al menos dos, más preferiblemente al menos tres vasos de cultivo, simultáneamente. Por ejemplo, se pueden colocar varios vasos de cultivo en una única habitación y se puede controlar la atmósfera gaseosa de la habitación entera. También es posible controlar la atmósfera gaseosa de más de un vaso de cultivo sin controlar la atmósfera gaseosa de más de un vaso de cultivo sin controlar la atmósfera de la habitación entera, por ejemplo, mediante el recubrimiento de varios vasos de cultivo con una tapa común o con tapas separadas. Además, se pueden combinar diferentes mediciones de acuerdo con la presente invención. Por ejemplo, en realizaciones particularmente preferidas la atmósfera gaseosa sobre el vaso de cultivo se calienta y adicionalmente el vaso de cultivo se recubre con una tapa.

Preferiblemente, al menos durante las etapas a) y d), más preferiblemente al menos durante las etapas a), b), d) y e), más preferiblemente durante las etapas a) a g) la atmósfera gaseosa sobre el cultivo bacteriano se mantiene a una temperatura que es como máximo 8 K, más preferiblemente como máximo 5 K, más preferiblemente como máximo 4 K, más preferiblemente como máximo 3 K, más preferiblemente como máximo 2 K, más preferiblemente como máximo 1 K, más preferiblemente como máximo 0,5 K, más preferiblemente como máximo 0,1 K por debajo de la temperatura más alta del medio de cultivo en el vaso de cultivo dentro de una distancia de la superficie de contacto de BC y la atmósfera gaseosa desde 0 a 2 cm medidos en perpendicular a la superficie de contacto. Controlar la temperatura en los intervalos adecuados es ventajoso para la producción eficaz de BC sin tejer. En realizaciones particularmente preferidas, la atmósfera gaseosa sobre el cultivo bacteriano se mantiene a una temperatura que es al menos tan alta como la temperatura del medio de cultivo en el vaso de cultivo dentro de una distancia de la superficie de contacto de BC y la atmósfera gaseosa de 0 a 2 cm medidos en perpendicular a la superficie de contacto. Preferiblemente, la atmósfera gaseosa sobre el cultivo bacteriano se mantiene a una temperatura que es como máximo 10 K, más preferiblemente como máximo 5 K, más preferiblemente como máximo 4 K, más preferiblemente como máximo 3 K, más preferiblemente como máximo 2 K, más preferiblemente como máximo 1 K, más preferiblemente como máximo 0,5 K, más preferiblemente como máximo 0,1 K por encima de la temperatura más alta del medio de cultivo en el vaso de cultivo dentro de una distancia de la superficie de contacto de BC y la atmósfera gaseosa desde 0 a 2 cm medidos en perpendicular a la superficie de contacto. Preferiblemente, la atmósfera gaseosa sobre el cultivo bacteriano se mantiene a una temperatura de como máximo ± 10 K, más preferiblemente como máximo ± 5 K, más preferiblemente como máximo ± 4 K, más preferiblemente como máximo ± 3 K más preferiblemente como máximo ± 2 K, más preferiblemente como máximo ± 1 K, más

preferiblemente como máximo ± 0,5 K, más preferiblemente como máximo ± 0,1 K en comparación con la temperatura del medio de cultivo en el vaso de cultivo dentro de una distancia de la superficie de contacto de BC y la atmósfera gaseosa de 0 a 2 cm medidos en perpendicular a la superficie de contacto.

Preferiblemente, al menos durante las etapas a) y d), más preferiblemente al menos durante las etapas a), b), d) y e), más preferiblemente durante las etapas a) a g) la atmósfera gaseosa sobre el cultivo bacteriano se mantiene a una temperatura que es como máximo 10 K, más preferiblemente como máximo 8 K, más preferiblemente como máximo 5 K, más preferiblemente como máximo 4 K, más preferiblemente como máximo 3 K, más preferiblemente como máximo 2 K, más preferiblemente como máximo 1 K, más preferiblemente como máximo 0,5 K, más preferiblemente como máximo 0,1 K por debajo de la temperatura más alta del medio de cultivo en el vaso de cultivo dentro de una distancia de la superficie de contacto de BC y la atmósfera gaseosa desde 0 a 5 cm medidos en perpendicular a la superficie de contacto. Controlar la temperatura en los intervalos adecuados es ventajoso para la producción eficaz de BC sin tejer. En realizaciones particularmente preferidas, la atmósfera gaseosa sobre el cultivo bacteriano se mantiene a una temperatura que es al menos tan alta como la temperatura del medio de cultivo en el vaso de cultivo dentro de una distancia de la superficie de contacto de BC y la atmósfera gaseosa de 0 a 5 cm medidos en perpendicular ala superficie de contacto. Preferiblemente, la atmósfera gaseosa sobre el cultivo bacteriano se mantiene a una temperatura que es como máximo 10 K, más preferiblemente como máximo 5 K, más preferiblemente como máximo 4 K, más preferiblemente como máximo 3 K, más preferiblemente como máximo 2 K, más preferiblemente como máximo 1 K, más preferiblemente como máximo 0,5 K, más preferiblemente como máximo 0,1 K por encima de la temperatura más alta del medio de cultivo en el vaso de cultivo dentro de una distancia de la superficie de contacto de BC y la atmósfera gaseosa desde 0 a 5 cm medidos en perpendicular a la superficie de contacto. Preferiblemente, la atmósfera gaseosa sobre el cultivo bacteriano se mantiene a una temperatura de como máximo ± 10 K, más preferiblemente como máximo ± 5 K, más preferiblemente como máximo ± 4 K, más preferiblemente como máximo ± 3 K, más preferiblemente como máximo ± 2 K, más preferiblemente como máximo ± 1 K, más preferiblemente como máximo ± 0,5 K, más preferiblemente como máximo ± 0,1 K en comparación con la temperatura del medio de cultivo en el vaso de cultivo dentro de una distancia de la superficie de contacto de BC y la atmósfera gaseosa de 0 a 5 cm medidos en perpendicular a la superficie de contacto.

Preferiblemente, al menos durante las etapas a) y d), más preferiblemente al menos durante las etapas a), b), d) y e), más preferiblemente durante las etapas a) a g) la atmósfera gaseosa sobre el cultivo bacteriano se mantiene a una temperatura que es como máximo 10 K, más preferiblemente como máximo 8 K, más preferiblemente como máximo 5 K, más preferiblemente como máximo 4 K, más preferiblemente como máximo 3 K, más preferiblemente como máximo 2 K, más preferiblemente como máximo 1 K, más preferiblemente como máximo 0,5 K, más preferiblemente como máximo 0,1 K por debajo de la temperatura más alta del medio de cultivo en el vaso de cultivo dentro de una distancia de la superficie de contacto de BC y la atmósfera gaseosa desde 0 a 10 cm medidos en perpendicular a la superficie de contacto. Controlar la temperatura en los intervalos adecuados es ventajoso para la producción eficaz de BC sin tejer. En realizaciones particularmente preferidas, la atmósfera gaseosa sobre el cultivo bacteriano se mantiene a una temperatura que es al menos tan alta como la temperatura del medio de cultivo en el vaso de cultivo dentro de una distancia de la superficie de contacto de BC y la atmósfera gaseosa de 0 a 10 cm medidos en perpendicular ala superficie de contacto. Preferiblemente, la atmósfera gaseosa sobre el cultivo bacteriano se mantiene a una temperatura que es como máximo 10 K, más preferiblemente como máximo 5 K, más preferiblemente como máximo 4 K, más preferiblemente como máximo 3 K, más preferiblemente como máximo 2 K, más preferiblemente como máximo 1 K, más preferiblemente como máximo 0,5 K, más preferiblemente como máximo 0,1 K por encima de la temperatura más alta del medio de cultivo en el vaso de cultivo dentro de una distancia de la superficie de contacto de BC y la atmósfera gaseosa desde 0 a 10 cm medidos en perpendicular a la superficie de contacto. Preferiblemente, la atmósfera gaseosa sobre el cultivo bacteriano se mantiene a una temperatura de como máximo ± 10 K, más preferiblemente como máximo ± 5 K, más preferiblemente como máximo ± 4 K, más preferiblemente como máximo ± 3 K, más preferiblemente como máximo ± 2 K, más preferiblemente como máximo ± 1 K, más preferiblemente como máximo ± 0,5 K, más preferiblemente como máximo ± 0,1 K en comparación con la temperatura del medio de cultivo en el vaso de cultivo dentro de una distancia de la superficie de contacto de BC y la atmósfera gaseosa de 0 a 10 cm medidos en perpendicular a la superficie de contacto.

Una temperatura de la atmósfera gaseosa que es ligeramente más alta que la temperatura del medio de cultivo es particularmente preferida en realizaciones en las que el vaso de cultivo se recubre con una tapa transparente para facilitar la inspección visual del proceso de producción ya que tal régimen de temperaturas previene o al menos reduce sustancialmente la condensación de líquido en las superficies de la tapadera que recubre el interior del vaso de cultivo. En realizaciones, en las que la tapadera no es transparente, también es ventajoso si la temperatura de la atmósfera gaseosa se ligeramente más alta que la temperatura del medio de cultivo porque la condensación no sólo compromete a la inspección visual sino que también conduce a la formación de gotas de condensado que pueden caer en el vaso de cultivo y de este modo alterar la producción de la BC sin tejer. Además, una temperatura de la atmósfera gaseosa que es ligeramente más alta que la temperatura del medio de cultivo es también ventajosa en realizaciones, en las que el vaso de cultivo no se recubre con una tapa, ya que esto puede ayudar a mantener la temperatura del medio de cultivo sustancialmente constante.

Al menos durante la etapa a) y preferiblemente durante la etapa opcional d), más preferiblemente al menos durante las etapas a), b) y durante las etapas opcionales d) y e), más preferiblemente durante las etapas a) a c) y durante las

etapas opcionales d) a g) la atmósfera gaseosa sobre el cultivo bacteriano se mantiene a una humedad relativa de al menos el 70% dentro de una distancia de la superficie de contacto de la BC y la atmósfera gaseosa de 0 a 2 cm medidos en perpendicular a la superficie de contacto. Los presentes inventores descubrieron que esto puede ayudar a mejorar la calidad de la superficie de la BC sin tejer producida. En particular, una humedad relativa alta puede ayudar a prevenir o al menos a reducir sustancialmente la deshidratación y el debilitamiento en la superficie de la BC sin tejer. El debilitamiento no es ventajoso porque se puede asociar con el secado de en la superficie, una menor porosidad y propiedades mecánicas deficientes de la BC sin tejer. En particular, la permeabilidad acuosa y/o la transpirabilidad de la BC sin tejer se pueden deteriorar por el secado. Además, la rugosidad de la superficie se la BC sin tejer se puede incrementar sustancialmente por el secado.

El control de la humedad de la atmósfera gaseosa se puede realizar mediante una variedad de diferentes mediciones según la presente invención. En realizaciones preferidas, el vaso de cultivo se recubre con una tapa. En realizaciones alternativas, la atmósfera gaseosa sobre el vaso de cultivo se calienta y/o humidifica selectivamente. La humidificación se realiza preferiblemente con un humidificador y puede implicar la vaporización y/o medios de pulverización. También es posible mantener la atmósfera gaseosa de la habitación entera en la que se coloca el vaso de cultivo a una humedad relativa alta deseada. Sin embargo, esto puede ser desventajoso en determinadas realizaciones, en particular en realizaciones que requieren la producción de la BC sin tejer bajo un nivel controlado de contaminación como, por ejemplo, en una sala blanca. Por lo tanto, en tales realizaciones, es preferible que no se mantenga la atmósfera gaseosa de la habitación entera en la que se localiza el vaso de cultivo a una humedad relativa alta deseada, sino que se mantenga la atmósfera gaseosa sobre el cultivo bacteriano a una humedad relativa alta ayudada por el recubrimiento del vaso de cultivo con una tapa. También es posible controlar la humedad de la atmósfera gaseosa de más de un vaso de cultivo sin controlar la atmósfera de la habitación entera. Esto se puede conseguir, por ejemplo, mediante el recubrimiento de varios vasos de cultivo con una tapadera común o mediante tapaderas separadas. Por otra parte, se pueden combinar mediciones diferentes de acuerdo con la presente invención. Por ejemplo, en realizaciones particularmente preferidas la atmósfera gaseosa sobre el vaso de cultivo se calienta y/o humidifica y el vaso de cultivo se recubre opcionalmente con una tapa.

Preferiblemente, al menos durante las etapas a) y durante la etapa opcional d), más preferiblemente al menos durante las etapas a), b) y durante las etapas opcionales d) y e), más preferiblemente durante las etapas a) a c) y durante las etapas opcionales d) a g) la atmósfera gaseosa sobre el cultivo bacteriano se mantiene a una humedad relativa de al menos el 80%, más preferiblemente al menos 85%, más preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 92%, más preferiblemente al menos 95%, más preferiblemente al menos 98%, más preferiblemente al menos 99% dentro de una distancia de la superficie de contacto de la BC y la atmósfera gaseosa de 0 a 2 cm medidos en perpendicular a la superficie de contacto. Controlar la humedad relativa en los intervalos indicados puede ayudar a mejorar la calidad de la superficie de la BC sin tejer producida. En particular, una humedad relativa alta puede ayudar a prevenir o al menos a reducir sustancialmente el secado y el debilitamiento de la superficie de la BC sin tejer.

Preferiblemente, al menos durante la etapa a) y durante la etapa opcional d), más preferiblemente al menos durante las etapas a), b) y durante las etapas opcionales d) y e), más preferiblemente durante las etapas a) a c) y durante las etapas opcionales d) a g) la atmósfera gaseosa sobre el cultivo bacteriano se mantiene a una humedad relativa de al menos el 70%, más preferiblemente de al menos 80%, más preferiblemente de al menos 85%, más preferiblemente de al menos 90%, más preferiblemente al menos 92%, más preferiblemente al menos 95%, más preferiblemente al menos 98%, más preferiblemente de menos 99% dentro de una distancia de la superficie de contacto de la BC y la atmósfera gaseosa de 0 a 5 cm medidos en perpendicular a la superficie de contacto. Controlar la humedad relativa en los intervalos indicados puede ayudar a mejorar la calidad de la superficie de la BC sin tejer producida. En particular, una humedad relativa alta puede ayudar a prevenir o al menos a reducir sustancialmente el secado y el debilitamiento de la superficie de la BC sin tejer.

Preferiblemente, al menos durante la etapa a) y durante la etapa opcional d), más preferiblemente al menos durante las etapas a), b) y durante las etapas opcionales d) y e), más preferiblemente durante las etapas a) a c) y durante las etapas opcionales d) a g) la atmósfera gaseosa sobre el cultivo bacteriano se mantiene a una humedad relativa de al menos el 70%, más preferiblemente de al menos 80%, más preferiblemente de al menos 85%, más preferiblemente de al menos 90%, más preferiblemente al menos 92%, más preferiblemente al menos 95%, más preferiblemente al menos 98%, más preferiblemente de menos 99% dentro de una distancia de la superficie de contacto de la BC y la atmósfera gaseosa de 0 a 10 cm medidos en perpendicular a la superficie de contacto. Controlar la humedad relativa en los intervalos indicados puede ayudar a mejorar la calidad de la superficie de la BC sin tejer producida. En particular, una humedad relativa alta puede ayudar a prevenir o al menos a reducir sustancialmente el secado y el debilitamiento de la superficie de la BC sin tejer.

Recubrir el vaso de cultivo con una tapa es también ventajoso por otra razón. Concretamente, recubrir el vaso de cultivo con una tapa puede reducir la tasa de flujo volumétrico de atmósfera gaseosa que introduce el volumen sobre el vaso de cultivo en el que la temperatura o la temperatura y humedad relativa se mantienen a los niveles deseados. El término "*tasa de flujo volumétrico*" indica el volumen de fluido, en particular de atmósfera gaseosa, que pasa por unidad de tiempo. Los presentes inventores descubrieron que el flujo de aire sobre el cultivo bacteriano puede dar como resultado un descenso en la eficacia de la producción de BC sin tejer. Además, la calidad de la superficie de la BC sin tejer se puede reducir por el flujo de aire sobre el cultivo bacteriano. En particular, la

formación de BC puede que no sea homogénea por lo que la BC sin tejer comprende distintos puntos de BC que tienen más densidad o menor estructura de entramado. Por otra parte, la superficie de BC sin tejer puede ser irregular debido a la formación no homogénea del entramado, así como debido al secado parcial de la superficie. Además, es preferible que se restrinja a los niveles deseados la tasa de flujo volumétrico de atmósfera gaseosa que introduce el volumen sobre el vaso de cultivo en el que se mantienen la temperatura o la temperatura y la humedad relativa. La restricción de dicha tasa de flujo volumétrico se puede conseguir o al menos apoyar mediante el recubrimiento del vaso de cultivo con una tapa. Cubrir el vaso de cultivo con una tapa es particularmente ventajoso en realizaciones que requieren la producción de BC sin tejer bajo un nivel de contaminación controlado como, por ejemplo, en una sala blanca, en particular una sala blanca de flujo laminar. Las salas blancas de flujo laminar se asocian con un flujo laminar de la atmósfera gaseosa particularmente grande que podría no ser ventajoso para el rendimiento y/o la calidad de la BC sin tejer. Por ejemplo, las salas blancas de las clases 1 a 5 (ISO) tienen velocidades de flujo de aire de 0,2 a 0,5 m/s. Las salas blancas de las clases 6, 7, 8 y superiores tienen cambios de aire por hora de 160 a 10$m^3/m^2$*h. Por lo tanto, es particularmente ventajoso en realizaciones en las que se produce BC sin tejer en una sala blanca si se restringe el flujo de la atmósfera gaseosa sobre el cultivo bacteriano.

La reducción del flujo de la atmósfera gaseosa sobre el cultivo bacteriano se puede conseguir mediante el recubrimiento del vaso de cultivo con una tapa. Alternativa o adicionalmente, el flujo de la atmósfera gaseosa sobre el cultivo bacteriano se puede reducir mediante un régimen de flujo de aire que previene de un flujo de aire fuerte sobre el cultivo bacteriano. Tal régimen de flujo de aire se puede conseguir mediante el empleo de elementos que re-direccionan el flujo de aire por lo que se reduce el flujo de aire sobre el cultivo bacteriano.

El volumen sobre el vaso de cultivo en el que se mantienen la temperatura o la temperatura y la humedad relativa a niveles constantes se pueden describir aproximadamente como las definidas por seis caras, concretamente (i) la superficie de contacto de BC con la atmósfera gaseosa, (ii) la cara superior del volumen que es esencialmente paralela a la superficie de contacto de BC y la atmósfera gaseosa, y (iii) a (vi) cuatro caras laterales que son esencialmente perpendiculares a las caras (i) y (ii) del volumen.

Cuando se indica en la presente memoria que el vaso de cultivo se cubre con una tapa, esto no significa que se cubran necesariamente todas las caras (ii) a (vi). En particular en realizaciones en las que el principal propósito de cubrir es reducir el flujo de aire en el volumen de la parte superior, puede ser suficiente si sólo se cubre la cara superior (ii) del volumen. Por otra parte, en realizaciones en las que el principal propósito de cubrir es reducir el flujo de aire en el volumen lateral, puede ser suficiente si se cubren sólo una o más de las caras laterales (iii) a (vi), en particular se cubren todas las caras laterales (iii) a (vi). Sin embargo, en otras realizaciones de la presente invención, en particular en realizaciones en las que la humedad relativa se debe controlar estrictamente, puede ser ventajoso que se cubran las caras superior (ii) y laterales (iii) a (vi).

En realizaciones en las que el vaso de cultivo se cubre con una tapa, es preferible que la tapa sea transparente para facilitar la evaluación óptica del proceso sin la necesidad de retirar la tapa.

En realizaciones preferidas, la tasa de flujo volumétrico de atmósfera gaseosa que introduce el volumen sobre el vaso de cultivo en el que se mantienen la temperatura o la temperatura y la humedad relativa a niveles definidos es, a una presión de 1013,25 hPa y una temperatura de 20ºC, menos de 1 $dm^3$ por minuto y por $m^2$ de la superficie de contacto a la que la atmósfera gaseosa puede introducir el volumen sobre el vaso de cultivo en el que se mantienen la temperatura o la temperatura y la humedad relativa a niveles definidos.

Preferiblemente, con el método de la presente invención se obtiene una BC sin tejer lisa con un rendimiento de 0,1 a 1 m por día de cultivo y por m de longitud del reactor con un espesor de 15 mm a 0,5 mm.

El método de la presente invención puede comprender además la etapa de esterilizar la BC sin tejer después de la extracción del vaso de cultivo en las etapas c) y/o f) del método de la presente invención. La esterilización de la BC sin tejer es ventajosa para una variedad aplicaciones de la BC sin tejer, en particular para aplicaciones dermatológicas, aplicaciones cosméticas, aplicaciones diagnósticas (por ejemplo, sistemas de cultivo celular), aplicaciones técnicas (membranas) y para aplicaciones médicas (por ejemplo, vendajes de heridas o implantes cutáneos). La BC sin tejer se esteriliza preferiblemente mediante radiación con electrones (radiación beta), mediante radiación con radiación gamma o mediante exposición a vapor de agua. Sin embargo, la exposición a vapor de agua es menos preferible porque requiere que los envases que contienen la BC sin tejer se abran debido a la expansión causada por el calor por lo que existe un riesgo sustancial de que aparezca re-contaminación después de la esterilización antes de que los envases se puedan cerrar y sellar. Por el contrario, la esterilización mediante radiación se puede realizar con envases cerrados y sellados para que no aparezca re-contaminación. Preferiblemente en particular, la BC sin tejer se esteriliza mediante radiación con electrones, en particular con un haz de electrones (referido en la presente memoria como “*haz-e*”).

Los presentes inventores descubrieron que la esterilización con haz-e es particularmente ventajosa para la esterilización de BC sin tejer porque la influencia de la esterilización con haz-e sobre la estructura del entramado de la BC es mínima en comparación a la esterilización con radiación gamma. Por lo tanto, la calidad de la BC sin tejer esterilizada con haz-e se mejora en comparación con la BC sin tejer esterilizada con radiación gamma. Por lo tanto, la calidad de la BC sin tejer esterilizada con haz-e es mejor en comparación a la BC sin tejer esterilizada con

radiación gamma. El descubrimiento de que la esterilización con haz-e no compromete la estructura del entramando de la BC sin tejer fue particularmente inesperada ya que se sabe que la esterilización con radiación gamma tiene una influencia indeseada sobre la estructura del entramado de BC y sobre la calidad de la BC sin tejer por lo que la esterilización con radiación se esperaba que en general tuviera desventajas. El hecho de que la esterilización con haz-e (radiación beta) sea ventajoso fue, por lo tanto, particularmente sorprendente. La Figura 2 muestra que la esterilización con haz-e no compromete la estructura del entramado de BC en comparación con la esterilización expuesta al vapor de agua.

La presente invención se refiere también al empleo de haz-e para la esterilización de BC. Preferiblemente, la BC sin tejer se esteriliza con una dosis de 10 a 50 kGy, más preferiblemente aproximadamente 15 a 25 kGy. Si la dosis es demasiado alta, la estructura del entramado de BC se podría comprometer. Si la dosis es demasiado baja, la BC sin tejer podría no esterilizarse lo suficiente.

La presente invención se refiere también a una BC sin tejer producida mediante el método de la presente invención, la BC sin tejer se caracteriza por la desviación estándar de la capacidad de absorción de agua (WAC, de sus siglas en inglés) y/o la capacidad de retención de agua (WRC, de sus siglas en inglés) es como máximo el 15% del valor medio correspondiente de WAC o WRC, respectivamente, en donde el valor medio y la desviación estándar se determinan a partir de como máximo 25 valores medidos independientemente y en donde los valores medidos independientemente se obtienen mediante el corte de muestras de tamaños esencialmente iguales de 2 cm x 2 cm de la BC sin tejer y determinando el valor de WAC y/o WRC de cada muestra de manera independiente.

Preferiblemente, la BC sin tejer en estado natural comprende BC en una cantidad de como máximo el 15%, preferiblemente como máximo 5% en peso. Más preferiblemente, la BC sin tejer en su estado natural comprende BC en una cantidad de 0,5 a 1,5% en peso. El término "*estado natural*" se refiere al estado de la BC sin tejer al extraerse del vaso de cultivo. La proporción de BC de la BC sin tejer se puede incrementar mediante al menos la extracción parcial del fluido. Especialmente, la BC sin tejer en la que se ha aumentado la proporción de BC mediante al menos la extracción parcial del fluido no está en su estado natural según la presente invención.

La suma del fluido y de la BC, en el estado natural de la BC sin tejer, preferiblemente es al menos del 80% en peso, en particular al menos 90% en peso, en particular al menos 95% en peso. En una realización la suma de los fluidos constituyentes y de la BC en la BC sin tejer, preferiblemente son esencialmente del 100%. En otras palabras, la BC sin tejer puede consistir esencialmente de fluido y de BC. Opcionalmente, la BC sin tejer consiste en fluido, BC y uno o varios aditivos, tales como componentes orgánicos, por ejemplo, almidón, chitosán, quitina, colágeno, metilcelulosa, carboximetilcelulosa, ácido hialurónico y/o alginatos, hidroxietilcelulosa, polivinilalcohol y/o polietilenóxido, o componentes inorgánicos, por ejemplo, óxidos metálicos, hidroxiapatita y/o grafeno. Los aditivos se pueden embeber en el entramado de BC y/o unirse al entramado de BC durante la producción de la BC sin tejer.

Tras la extracción del vaso de cultivo, el fluido es esencialmente el medio de cultivo. Para varias aplicaciones, el medio de cultivo se reemplaza preferiblemente mediante un fluido diferente, en particular por agua y/o fluido a base de agua que comprende agua, particularmente de agua ionizada, en una cantidad de al menos el 85%, y aún más preferiblemente el 99%.

Un espesor medio relativamente bajo de la BC sin tejer permite un par de aplicaciones, particularmente aplicaciones de BC sin tejer en su estado natural, que significa sin reducción del contenido de fluido (por ejemplo, mediante impacto mecánico), en particular para aplicaciones dermatológicas, aplicaciones cosméticas, aplicaciones diagnósticas (por ejemplo, sistemas de cultivo celular), aplicaciones técnicas (membranas), para aplicaciones médicas (por ejemplo, vendajes de heridas o implantes cutáneos) y aplicaciones farmacéuticas (por ejemplo, sistemas de transporte de fármacos). Sin embargo, un producto que tiene un espesor medio, que es demasiado bajo, puede gotear más fácilmente. El espesor de la BC sin tejer preferiblemente es una media de al menos 0,5 mm, más preferiblemente al menos 0,8, aún más preferiblemente al menos 1,0 mm, aún más preferiblemente al menos 1,5 mm, y aún más preferiblemente al menos 2,0 mm. Por otro lado, la BC sin tejer que tiene un espesor medio que es muy alto, puede ser desventajoso para determinadas aplicaciones, en particular para aplicaciones dermatológicas. La razón es que un espesor muy alto puede causar una sensación incómoda y puede que no se adhiera a la piel sin la necesidad de otra adherencia u otros medios de fijación. El espesor medio de la BC sin tejer preferiblemente es como máximo 8,0 mm, más preferiblemente como máximo 6,0 mm, aún más preferiblemente como máximo 5,0 mm. El espesor medio dela BC sin tejer se puede determinar mediante métodos habituales conocidos por el experto en la técnica, que comprende, por ejemplo, mediciones con un calibrador vernier. Las características de BC permiten a la BC sin tejer una buena fuerza de tracción.

Preferiblemente, las fibras de BC de la BC sin tejer tienen un diámetro medio de 30 a 250 nm. El diámetro se determina preferiblemente por imágenes de microscopio electrónico de barrido (SEM).

La densidad de masa volumétrica de la BC sin tejer, particularmente del contenido de BC de la BC sin tejer, es al menos 0,50 g/cm$^3$, preferiblemente al menos 0,55 g/cm$^3$. La densidad de masa volumétrica de la BC sin tejer, particularmente del contenido de BC de la BC sin tejer, es como máximo 1,50 g/cm$^3$, preferiblemente como máximo 1,25 g/cm$^3$.

La densidad de masa volumétrica de la BC sin tejer, particularmente del contenido de BC de la BC sin tejer, preferiblemente es de al menos 0,50 g/cm$^3$ a como máximo 1,50 g/cm$^3$, más preferiblemente de cómo máximo 0,55 g/cm$^3$ a como máximo 1,50 g/cm$^3$, aún más preferiblemente de al menos 0,50 g/cm$^3$ a como máximo 1,25 g/cm$^3$, y lo más preferiblemente de al menos 0,55 g/cm$^3$ a como máximo 1,25 g/cm$^3$.

El peso medio del peso molecular $M_w$ de la BC sin tejer, particularmente de la BC de la BC sin tejer, preferiblemente es como máximo 1.500.000 g/mol, más preferiblemente como máximo 1.200.000 g/mol, más preferiblemente como máximo 1.000.000 g/mol, más preferiblemente como máximo 900.000 g/mol, como máximo 850.000 g/mol, como máximo 800.000 g/mol, lo más preferiblemente como máximo 780.000 g/mol. El peso medio del peso molecular $M_w$ de la BC sin tejer, particularmente de la BC de la BC sin tejer, preferiblemente es al menos 100.000 g/mol, preferiblemente al menos 250.000 g/mol, al menos 300.000 g/mol, al menos 400.000 g/mol, lo más preferiblemente al menos 500.000 g/mol. Si el peso medio del peso molecular $M_w$ es muy bajo, el índice de polidispersidad deseado no se puede conseguir como se describe a continuación.

El número medio del peso molecular $M_n$ de la BC sin tejer, particularmente de la BC de la BC sin tejer, preferiblemente es como máximo 500.000 g/mol, preferiblemente como máximo 400.000 g/mol, como máximo 450.000 g/mol, como máximo 400.000 g/mol, lo más preferiblemente como máximo 360.000 g/mol. Si el número medio del peso molecular Mn es muy alto, el índice de polidispersidad deseado puede no alcanzarse como se describe a continuación. El número medio del peso molecular Mn de la BC sin tejer, particularmente de la BC de la BC sin tejer, preferiblemente es al menos 100.000 g/mol, preferiblemente al menos 150.000 g/mol, al menos 200.000 g/mol, al menos 250.000 g/mol, lo más preferiblemente al menos 300.000 g/mol. Si el número medio del peso molecular Mn es muy bajo, la estabilidad del material se puede alterar.

El grado de polimerización es el número medio de unidades monoméricas en los polímeros de BC de un entramado de BC específico. Se puede expresar como la proporción del número medio del peso molecular de los respectivos polímeros de BC para el peso molecular de la unidad monomérica.

El índice de polidispersidad (PDI) es una medida de la heterogeneidad de la distribución de la masa molecular de los polímeros de BC de un entramado de BC respectivo. Se calcula como la proporción del peso medio del peso molecular respecto al número medio del peso molecular de los respectivos polímeros de BC. Valores de PDI más altos indican una distribución del peso molecular más amplia de los polímeros de BC de un entramado de BC. La longitud de las cadenas de celulosa del producto es preferiblemente relativamente uniforme, la cual se puede reflejar mediante un índice de polidispersidad relativamente bajo ($M_w$ / $M_n$).

El PDI ($M_w$ / $M_n$) de la BC sin tejer preferiblemente es bajo. Se sabe que un PDI relativamente bajo se refiere a un material más estable y a una estructura porosa. Un PDI cercano a 1 reflejaría una homogeneidad que se acerca a la óptima. Según al menos algunas realizaciones, preferiblemente el índice de polidispersidad PDI ($M_w$ / $M_n$) de la BC sin tejer es inferior a 3,5, preferiblemente inferior a 3,0, más preferiblemente inferior a 2,75 y aún más preferiblemente inferior a 2,5, aún más preferiblemente inferior a 2,0, aún más preferiblemente inferior a 1,75, y lo más preferiblemente inferior a 1,5.

Según al menos algunas realizaciones, preferiblemente la BC sin tejer se caracteriza mediante un $DP_n$ de al menos 1.000, más preferiblemente al menos 1.500, más preferiblemente al menos 1.700. Preferiblemente, el producto se caracteriza por un $DP_n$ de como máximo 5.000, más preferiblemente como máximo 3.000, aún más preferiblemente como máximo 2.500, aún más preferiblemente como máximo 2.200.

El contenido de BC de la BC sin tejer comprende preferiblemente grupos carbonilo en una cantidad de menos de 8,5 µmol/g, preferiblemente de menos de 8,0 µmol/g, más preferiblemente de menos de 7,5 µmol/g, aún más preferiblemente de menos de 7,0 µmol/g, aún más preferiblemente de menos de 6,0 µmol/g, y aún más preferiblemente de menos de 5,75 µmol/g. El contenido de BC de la BC sin tejer comprende preferiblemente grupos carbonilo en una cantidad de al menos 1,0 µmol/g, más preferiblemente de al menos 1,5 µg/mol, aún más preferiblemente de al menos 2,0 µg/mol, aún más preferiblemente de al menos 2,5 µg/mol, y lo más preferiblemente de al menos 2,75 µg/mol.

Para la celulosa, particularmente los productos que contienen celulosa, la cristalinidad Ic es un parámetro importante. El grado de cristalinidad se determina preferiblemente mediante espectroscopía NMR en estado sólido. Una baja cristalinidad Ic se puede acompañar particularmente por un descenso en la permeabilidad para gases y líquidos. Para el propósito de la presente invención, particularmente la BC sin tejer inventiva y su uso, se desea una cristalinidad Ic relativamente alta, para proporcionar una permeabilidad a gases y a líquidos relativamente alta. Preferiblemente, la cristalinidad Ic de la BC de la BC sin tejer es al menos del 55%, más preferiblemente al menos 60%, más preferiblemente al menos 65%, más preferiblemente al menos 70%, lo más preferiblemente al menos 80%. Preferiblemente, la cristalinidad completa Ic de la BC de la BC sin tejer es como máximo del 95%, más preferiblemente como máximo 90%, más preferiblemente como máximo 85%.

Un experto en la técnica reconocerá que la BC puede existir en varios polimorfos cristalinos. En realizaciones particularmente preferidas de la presente invención, la BC cristaliza simultáneamente en una estructura tricíclica de una cadena Iα, y una modificación de dos cadenas Iβ. En tales realizaciones, ambos polimorfos se empaquetan en

una disposición de cadena paralela, pero de varias proporciones en una que contiene BC sin tejer, dependiendo del origen y del método de producción. Preferiblemente, la BC de la BC sin tejer inventiva comprende celulosa Iα en una cantidad de al menos 10%, preferiblemente al menos 20%, más preferiblemente al menos 30% en peso de la BC sin tejer. Preferiblemente, la BC de la BC sin tejer inventiva comprende celulosa Iα en una cantidad de cómo máximo 90%, preferiblemente como máximo 70%, más preferiblemente como máximo 50% en peso seco de la BC sin tejer. Adicional o alternativamente, la BC de la BC sin tejer inventiva comprende preferiblemente celulosa Iβ en una cantidad de al menos 1%, preferiblemente al menos 5%, más preferiblemente al menos 10% en peso. Preferiblemente la BC de la BC sin tejer inventiva comprende celulosa Iβ en una cantidad de como máximo 90%, preferiblemente como máximo 80%, más preferiblemente como máximo 70%, aún más preferiblemente como máximo 60%, aún más preferiblemente como máximo 50%, y lo más preferiblemente como máximo 45% en peso seco. Preferiblemente, la cantidad de celulosa Iα y Iβ se determina sobre la base de CP/MAS 13C NMR. Los intervalos anteriores son preferibles para conseguir las propiedades deseadas de la BC sin tejer.

Particularmente, la BC sin tejer inventiva puede comprender celulosa Iα y celulosa Iβ en una proporción de masa de como máximo 2,75, preferiblemente como máximo 2,5, más preferiblemente como máximo 2,4. Preferiblemente, la BC sin tejer inventiva puede comprender celulosa Iα y celulosa Iβ en una proporción de masa de al menos 1,5, preferiblemente al menos 2,0, más preferiblemente al menos 2,25. Las proporciones anteriores son preferibles para conseguir las propiedades deseadas de la BC sin tejer.

Según la presente invención, la BC se puede emplear para proporcionar fluidos, particularmente agua, y opcionalmente al menos un agente activo, para un área de la piel tratada. Una capacidad de absorción de agua (WAC) preferible y/o una capacidad de retención de agua preferible (WRC) de la BC sin tejer pueden facilitar un incremento en el efecto de tratamiento deseado. Particularmente, la BC sin tejer inventiva puede tener una capacidad de absorción de agua (WAC) de al menos 5.000%, más preferiblemente 9.000%, más preferiblemente al menos 15.000%.

Como se describe en la presente memoria, la capacidad de absorción de agua se calcula mediante la siguiente fórmula:

WAC = masa(húmeda) / masa(seca) * 100%.

Preferiblemente, la BC sin tejer tiene una capacidad de absorción de agua (WAC) de cómo máximo 20,000%, más preferiblemente como máximo 10,000%, y aún más preferiblemente como máximo 8,000%. Opcional y preferiblemente, la BC sin tejer tiene una capacidad de absorción de agua (WAC) del 2,000% al 4,000%. La capacidad de retención de agua (WRC) de la BC sin tejer inventiva puede ser de al menos el 500%, preferiblemente al menos 600%, más preferiblemente al menos 700%, lo más preferiblemente al menos 750%. La capacidad de retención de agua (WRC) de la BC sin tejer inventiva puede ser de como máximo 3.000%, preferiblemente como máximo 2.000%, más preferiblemente como máximo 1.000%, lo más preferiblemente como máximo 950%. La capacidad de retención de agua (WRC) como se emplea en la presente memoria es la proporción de masa húmeda a la WAC máxima y la masa seca determinada después de la centrifugación de la BC sin tejer durante 15 minutos a 5.000 rpm.

Como se describe en la presente memoria, la capacidad de retención de agua se calcula mediante la siguiente fórmula:

WRC = (masa(húmeda) – masa(seca) / masa(seca) * 100%.

Como se describe anteriormente, la BC sin tejer de la presente invención se caracteriza preferiblemente por un alto grado de homogeneidad. Preferiblemente en particular, la BC sin tejer de la invención tiene una estructura de entramado muy homogénea, en particular una estructura de densidad de entramado muy homogénea, y/o una estructura de superficie particularmente homogénea. Las estructuras homogéneas de la BC sin tejer contribuyen preferiblemente a la homogeneidad de varias propiedades físicas y/o químicas de la BC sin tejer. En realizaciones preferidas particularmente, la WAC y/o WRC de la BC sin tejer son altamente reproducibles.

Preferiblemente, la estructura de la BC sin tejer es tan homogénea que la desviación estándar de la WAC es como máximo 15%, más preferible como máximo 10%, más preferible como máximo 7%, más preferible como máximo 5%, más preferible como máximo 4%, más preferible como máximo 3%, incluso más preferible como máximo 2%, particularmente más preferible como máximo 1% del respectivo valor medio de WAC, en donde el valor medio y la desviación estándar se determinan de como máximo 25, preferiblemente como máximo 20, más preferible como máximo 15, más preferible como máximo 10, más preferible como máximo 7, más preferible como máximo 6 valores medidos independientemente. Preferiblemente, el valor medio y la desviación estándar se determinan a partir de al menos 3 valores medidos independientemente, más preferiblemente a partir de al menos 4 valores medidos independientemente, más preferiblemente a partir de al menos 5 valores medidos independientemente. En realizaciones preferidas, el valor medio y la desviación estándar se determinan a partir de 5 valores medidos independientemente, más preferiblemente a partir de 6 valores medidos independientemente.

Los valores medidos independientemente se obtienen mediante el corte de muestras de tamaño esencialmente igual de 2 cm x 2 cm de la BC sin tejer y determinando el valor WAC para cada una de las muestras de manera

independiente. La persona experta sabe cómo determinar la media y la desviación estándar en base a un grupo de valores medidos. El valor medio se determina mediante la división de la suma de los valores medidos de manera individual por el número de valores medidos. La desviación estándar corresponde a la raíz cuadrada de la suma las desviaciones al cuadrado de los valores medidos de manera individual a partir del valor medio de los valores medidos, en donde la suma se divide por el número de valores medidos menos la raíz cuadrada anterior.

Preferiblemente, la estructura de la BC sin tejer es tan homogénea que la desviación estándar de la WRC es como máximo 15%, más preferible como máximo 10%, más preferible como máximo 7%, más preferible como máximo 5%, más preferible como máximo 4%, más preferible como máximo 3%, incluso más preferible como máximo 2%, particularmente preferible como máximo 1% del respectivo valor medio de WRC, en donde el valor medio y la desviación estándar se determinan a partir de como máximo 25, preferiblemente como máximo 20, más preferiblemente como máximo 15, más preferiblemente como máximo 10, más preferiblemente como máximo 7, más preferiblemente como máximo 6 valores medidos independientemente. Preferiblemente, el valor medio y la desviación estándar se determinan a partir de al menos 3 valores medidos independientemente, más preferiblemente a partir de al menos 4 valores medidos independientemente, más preferiblemente a partir de al menos 5 valores medidos independientemente. En realizaciones preferidas, el valor medio y la desviación estándar se determinan a partir de 5 valores medidos independientemente, más preferiblemente a partir de 6 valores medidos independientemente.

Los valores medidos independientemente se obtienen mediante el corte de muestras de tamaño esencialmente igual de 2 cm x 2 cm de la BC sin tejer y determinando el valor WRC para cada una de las muestras de manera independiente. La persona experta sabe cómo determinar la media y la desviación estándar en base a un grupo de valores medidos. El valor medio se determina mediante la división de la suma de los valores medidos de manera individual por el número de valores medidos. La desviación estándar corresponde a la raíz cuadrada de la suma de las desviaciones al cuadrado de los valores medidos de manera individual a partir del valor medio de los valores medidos, en donde la suma se divide por el número de valores medidos menos la raíz cuadrada anterior.

Preferiblemente, la estructura de la BC sin tejer es tan homogénea que la desviación estándar de tanto la WAC como la WRC es como máximo 15%, más preferible como máximo 10%, más preferible como máximo 7%, más preferible como máximo 5%, más preferible como máximo 4%, más preferible como máximo 3%, incluso más preferible como máximo 2%, particularmente preferible como máximo 1% del respectivo valor medio de WAC y WRC, respectivamente, en donde el valor medio y la desviación estándar se determinan a partir de cómo máximo 25, preferiblemente como máximo 20, más preferible como máximo 15, más preferible como máximo 10, más preferible como máximo 7, más preferible como máximo 6 valores medidos independientemente. Preferiblemente, el valor medio y la desviación estándar se determinan a partir de al menos 3 valores medidos independientemente, más preferiblemente a partir de al menos 4 valores medidos independientemente, más preferiblemente a partir de al menos 5 valores medidos independientemente. En realizaciones preferidas, el valor medio y la desviación estándar se determinan a partir de 5 valores medidos independientemente, más preferiblemente a partir de 6 valores medidos independientemente.

Los valores medidos independientemente se obtienen mediante el corte de muestras de tamaño esencialmente igual de 2 cm x 2 cm de la BC sin tejer y determinando los valores WAC y WRC para cada una de las muestras de manera independiente. La persona experta sabe cómo determinar la media y la desviación estándar en base a un grupo de valores medidos. El valor medio se determina mediante la división de la suma de los valores medidos de manera individual por el número de valores medidos. La desviación estándar corresponde a la raíz cuadrada de la suma de las desviaciones al cuadrado de los valores medidos de manera individual a partir del valor medio de los valores medidos, en donde la suma se divide por el número de valores medidos menos la raíz cuadrada anterior.

En particular para el uso de la BC sin tejer en aplicaciones cosméticas, dermatológicas y farmacéuticas, es ventajoso si la BC sin tejer se adapta al área de la piel a tratar, particularmente a la geometría y a las dimensiones de la cara. En particular para estas propiedades, la fuerza de tracción de la BC sin tejer es de importancia. Particularmente, una fuerza de tracción demasiado baja no facilitará que la BC sin tejer sea flexible, y por tanto, no facilitará que la BC sin tejer se adapte a la irregularidad de la piel, particularmente a la irregularidad de la cara sin el riesgo de desgarro. La fuerza de tracción de la BC sin tejer inventiva preferiblemente es más de 100 MPa, más preferiblemente más de 252 MPa, más preferiblemente más de 275 MPa, más preferiblemente más de 300 MPa, y lo más preferiblemente más de 310 MPa. La fuerza de tracción de la BC sin tejer inventiva preferiblemente es menos de 1.000 MPa, preferiblemente menos de 750 MPa, más preferiblemente menos de 500 MPa, y lo más preferiblemente menos de 400 MPa. La fuerza de tracción como se refiere en la presente memoria se determina preferiblemente después de la presión con calor de la BC sin tejer empleando un dispositivo TIRAtest 2710 de medición universal de fuerza nominal 1,5 kN. Preferiblemente, la fuerza de tracción como se refiere en la presente memoria se determina según a DIN EN ISO 527-1:2012-06 y/o DIN EN ISO 527-2:2012-06.

La presente memoria se refiere también al uso de la BC sin tejer de la invención en productos del campo dermatológico, médico, farmacéutico, diagnóstico, nutricional, cosmético, técnico y de equipos protectores. De acuerdo con la presente memoria es en particular el uso de la BC sin tejer de la invención para aplicaciones dermatológicas, aplicaciones cosméticas, aplicaciones diagnósticas (por ejemplo, sistemas de cultivo celular),

aplicaciones técnicas (membranas) y para aplicaciones médicas (por ejemplo, vendajes de heridas o implantes cutáneos).

La presente invención comprende también un aparato para producir BC sin tejer. El aparato comprende:

A) Al menos un vaso de cultivo,

B) Medios para añadir medio de cultivo fresco o reciclado y/o eliminar del vaso de cultivo el medio de cultivo consumido,

C) Medios para extraer del vaso de cultivo la BC sin tejer producida,

en donde el vaso de cultivo tiene una forma sustancialmente rectangular con una longitud de al menos 100 cm y una anchura de al menos 10 cm, en donde el aspecto de la proporción de la longitud para la anchura es de 1,5 a 10000 y en donde el aparato comprende medios para mantener la atmósfera gaseosa sobre el medio de cultivo a una temperatura y humedad relativa predeterminada dentro de una distancia a partir del medio de cultivo de hasta 2 cm, en donde la temperatura predeterminada se desvía de la temperatura del medio de cultivo en el vaso de cultivo en como máximo ± 10 K y la humedad relativa es al menos del 70%.

El aparato de la presente invención comprende al menos un vaso de cultivo según la característica A) descrita anteriormente. Preferiblemente, el aparato comprende exactamente un vaso de cultivo. En realizaciones alternativas, el aparato comprende al menos dos, más preferiblemente al menos tres vasos de cultivo.

El vaso de cultivo tiene un área de síntesis de al menos 1000 $cm^2$, preferiblemente al menos 1 $m^2$ y aún más preferiblemente al menos 10 $m^2$. Preferiblemente, el vaso de cultivo tiene un área de síntesis de como máximo 50000 $m^2$, más preferiblemente como máximo 20000 $m^2$, más preferiblemente como máximo 1000 $m^2$, aún más preferiblemente como máximo 100 $m^2$, aún más preferiblemente como máximo 50 $m^2$.

El vaso de cultivo tiene sustancialmente forma rectangular. El aspecto de la proporción de la longitud para la anchura del vaso de cultivo es al menos 1,5. Preferiblemente, el aspecto de la proporción de la longitud a la anchura del vaso de cultivo es de al menos 2, más preferiblemente al menos 3, más preferiblemente al menos 5, más preferiblemente al menos 10, más preferiblemente al menos 15, más preferiblemente al menos 20, más preferiblemente al menos 25, más preferiblemente al menos 30, más preferiblemente al menos 50, más preferiblemente al menos 100. Sin embargo, el aspecto respectivo a la proporción no debe ser muy grande. Preferiblemente el aspecto de la proporción de la longitud a la anchura del vaso de cultivo es como máximo 10000, preferiblemente como máximo 8000, más preferiblemente como máximo 5000, más preferiblemente como máximo 2000, más preferiblemente como máximo 1000, más preferiblemente como máximo 500. Los inventores encontraron que tales aspectos de las proporciones son ventajosos particularmente para la producción eficaz de BC sin tejer.

El vaso de cultivo tiene una longitud de al menos 100 cm, preferiblemente al menos 200 cm, más preferiblemente al menos 500 cm, más preferiblemente al menos 1000 cm. Preferiblemente, el vaso de cultivo tiene una longitud de como máximo 1000 m, más preferiblemente como máximo 200 m, más preferiblemente como 100 m, más preferiblemente como máximo 50 m, más preferiblemente como máximo 20 m.

El vaso de cultivo tiene una anchura de al menos 10 cm, más preferiblemente al menos 20 cm, más preferiblemente al menos 50 cm, más preferiblemente al menos 100 cm. Preferiblemente, el vaso de cultivo tiene una anchura de como máximo 100 m, más preferiblemente como máximo 20 m, más preferiblemente como máximo 10 m, más preferiblemente como máximo 5 m, más preferiblemente como máximo 2 m.

Preferiblemente, el vaso de cultivo tiene un sistema control de la temperatura que comprende un dispositivo de calor y al menos un sensor de temperatura para mantener y controlar la temperatura del medio de cultivo. Preferiblemente, el dispositivo de calor proporciona calor para mantener una temperatura predeterminada que se desvía como máximo ± 5 K, más preferiblemente como máximo ± 4 K, más preferiblemente como máximo ± 3 K, más preferiblemente como máximo ± 2 K, más preferiblemente como máximo ± 1 K, más preferiblemente como máximo ± 0,5 K, más preferiblemente como máximo ± 0,1 K, más preferiblemente como máximo ± 0,01 K dentro del medio de cultivo.

Según la característica B) descrita anteriormente, el aparato comprende medios para añadir medio de cultivo fresco y reciclado y/o para eliminar el medio de cultivo consumido del vaso de cultivo. Preferiblemente, los medios comprenden una o más aperturas en el vaso de cultivo que facilitan la adición del medio de cultivo fresco o reciclado y/o la eliminación del medio de cultivo consumido del vaso de cultivo. Las aperturas pueden comprender una o más aperturas superiores. Los vasos de cultivo con una apertura superior central se conocen de la técnica anterior. Sin embargo, los presentes inventores descubrieron que puede ser ventajoso para la producción de BC si los medios para añadir medio de cultivo fresco o reciclado y/o para eliminar del vaso de cultivo el medio consumido se realizan en la parte inferior del vaso de cultivo debido a que la producción de BC sin tejer se puede ver comprometida significativamente si la adición y/o la eliminación del medio de cultivo se realiza desde la parte superior del vaso de cultivo. Por el contrario, la adición y/o la eliminación del medio de cultivo desde la parte inferior no es problemática. De hecho, los medios para añadir medio de cultivo fresco o reciclado y/o eliminar el medio de cultivo consumido del

vaso de cultivo se realizan preferiblemente por la parte inferior del vaso de cultivo. Los medios se pueden realizar también por las paredes laterales del vaso de cultivo. Sin embargo, si los medios se realizan en las paredes laterales del vaso de cultivo, se prefiere que los medios se realicen próximos a la parte inferior del vaso de cultivo para que la adición y/o la eliminación del medio de cultivo se pueda realizar por debajo de la superficie de contacto de la BC y del medio gaseoso para que no se altere la producción de BC mediante la adición y/o eliminación del medio de cultivo. Preferiblemente, las aperturas se conectan a tubos y/o vasos de un modo hermético que previene la pérdida de medio de cultivo del vaso de cultivo durante la adición y/o eliminación del medio de cultivo.

Según la característica C) descrita anteriormente, el aparato comprende medios para extraer del vaso de cultivo la BC sin tejer producida. Los presentes inventores descubrieron que era ventajoso si la BC sin tejer producida se extraía del vaso del cultivo mediante arrastre y/o presión de la BC sin tejer fuera del vaso de cultivo en una dirección sustancialmente paralela a la superficie de contacto de la BC y la atmósfera gaseosa. Esta forma de extracción es ventajosa para minimizar la alteración del cultivo bacteriano y para minimizar los cambios estructurales de la BC sin tejer que podrían aparecer en caso contrario. En particular, se pueden minimizar cambios estructurales del entramado de BC o incluso evitar mediante esta forma de extracción. Por lo tanto, los medios para eliminar del vaso de cultivo la BC sin tejer producida son preferiblemente medios de arrastre y/o presión que facilitan ejercer una fuerza en la BC sin tejer que se dirige sustancialmente en paralelo a la superficie de contacto de la BC y la atmósfera gaseosa. Para ejercer dicha fuerza, los medios de arrastre y/o presión son preferiblemente poner en contacto la BC sin tejer directa o indirectamente a través de medios de contacto, tales como ganchos, eslingas, o similares. Preferiblemente los medios de arrastre se colocan esencialmente fuera del vaso de cultivo y se extienden en el medio de cultivo sólo con una mínima parte o a través de medios de contacto para contactar la BC sin tejer. Medios de arrastre preferidos son los rodillos, resortes, o similares. Los medios de presión se localizan preferiblemente esencialmente dentro del vaso de cultivo. Medios de presión preferidos son los rodillos, cintas transportadoras, o similares. Preferiblemente, los medios de arrastre y/o presión se conectan a un dispositivo de control para controlar el tiempo y la velocidad de extracción de BC.

Los aparatos comprenden medios para mantener la atmósfera gaseosa sobre el medio de cultivo a una temperatura predeterminada y una humedad relativa dentro de una distancia del medio de cultivo de hasta 2 cm, preferiblemente hasta 5 cm, más preferiblemente hasta 10 cm. La temperatura predeterminada se desvía de la temperatura del medio de cultivo en el vaso de cultivo como máximo ± 10 K, preferiblemente como máximo ± 5 K, más preferiblemente como máximo ± 4 K, más preferiblemente como máximo ± 3 K, más preferiblemente como máximo ± 2 K, más preferiblemente como máximo ± 1 K, más preferiblemente como máximo ± 0,5 K, más preferiblemente como máximo ± 0,1 K. La humedad relativa predeterminada es al menos del 70%, más preferiblemente de al menos 80%, más preferiblemente de al menos 85%, más preferiblemente de al menos 90%, más preferiblemente al menos 92%, más preferiblemente al menos 95%, más preferiblemente al menos 98%, más preferiblemente al menos 99%.

Preferiblemente, los medios para mantener la atmósfera gaseosa sobre el medio de cultivo a una temperatura y humedad relativa predeterminada dentro de una distancia predeterminada del medio de cultivo comprende una tapa para cubrir el vaso de cultivo. Preferiblemente, la tapa se configura para que sea desmontable y se conecte al vaso de cultivo para facilitar recubrir y destapar el vaso de cultivo de forma repetible. En realizaciones preferidas, el recubrimiento es una tapa. Preferiblemente, el recubrimiento es transparente para facilitar la inspección visual del proceso de producción sin la necesidad de quitar el recubrimiento.

Alternativa o adicionalmente, el recubrimiento puede contener una capa de aislamiento o una capa de aislamiento se puede colocar en la parte superior del recubrimiento para mejorar el mantenimiento de la temperatura y la humedad del aire sobre el medio de cultivo en el dispositivo de cultivo.

Alternativa o adicionalmente, los medios para mantener la atmósfera gaseosa sobre el medio de cultivo a una temperatura y humedad predeterminada dentro de una distancia predeterminada del medio de cultivo puede comprender uno o más medios de calentamiento. Los medios de calentamiento pueden ser calentadores eléctricos, calentadores gaseosos, calentadores conectivos, calentadores de contacto o radiantes, o similares, o una combinación de dos o más de ellos.

Alternativa o adicionalmente, los medios para mantener la atmósfera gaseosa sobre el medio de cultivo a una temperatura y/o humedad predeterminada dentro de una distancia predeterminada del medio de cultivo puede comprender uno o más humidificadores, preferiblemente en combinación con un dispositivo de calor para mantener la temperatura deseada del aire humidificado.

Preferiblemente, los aparatos comprenden medios para mantener el medio de cultivo en el vaso de cultivo a una temperatura predeterminada. Preferiblemente, la humedad predeterminada es de 20ºC a 40ºC, más preferiblemente de 25ºC a 33ºC, más preferiblemente de 28ºC a 30ºC. Preferiblemente, los medios para mantener el medio de cultivo en el vaso de cultivo a una temperatura predeterminada comprenden al menos un dispositivo de calentamiento, tal como calentadores eléctricos, calentadores gaseosos, calentadores radiantes, o similares, o una combinación de dos o más de ellos.

**Breve descripción de las Figuras**

La Figura 1 muestra imágenes de microscopio electrónico de barrido que permiten la comparación de los bordes de corte obtenidos mediante el fluido de corte (panel derecho) con los bordes de corte obtenidos mediante el corte con un bisturí (panel izquierdo). Las imágenes de microscopio electrónico de barrido muestran los bordes

con un aumento de 300x (panel superior) y 3000x (panel inferior), respectivamente.

La Figura 2 muestra imágenes de microscopio electrónico de barrido de BC sin tejer esterilizada con vapor de agua (panel superior) o con un haz e (panel inferior). Las imágenes de microscopio electrónico de barrido muestran la BC con un aumento de 300x (panel izquierdo) y 3000x (panel derecho), respectivamente. Especialmente, la estructura del entramado de BC no se ve afectada mediante la esterilización con un haz de electrones en comparación con la esterilización con vapor de agua.

**Ejemplos**

Ejemplo 1

La BC sin tejer se produjo mediante el método de la presente invención. La BC sin tejer producida que tiene un espesor medio de 2 mm se extrajo del medio de cultivo y se separó de la BC sin tejer que permanecía en el vaso de cultivo. La extracción se realizó bien mediante el corte con un bisturí o bien mediante fluido de corte. Los bordes de corte se estudiaron mediante la toma de imágenes de microscopio electrónico de barrido. Se descubrió que los bordes de corte producidos por el fluido de corte eran más suaves en comparación con los bordes de corte producidos por un bisturí. Los resultados se muestran en la Figura 1.

Ejemplo 2

La BC sin tejer se produjo mediante el método de la presente invención. En particular, la BC sin tejer se esterilizó con haz de electrones o mediante la exposición a vapor de agua después de la extracción y la separación de la BC del vaso de cultivo que permanecía en el vaso de cultivo. La estructura del entramado de la BC se estudió mediante un microscopio electrónico de barrido. Se descubrió que la estructura del entramado no se alteraba ni mediante esterilización con vapor de agua ni mediante esterilización con haz de electrones.

Ejemplo 3

Se produjeron mediante el método de la presente invención tres materiales distintos de BC sin tejer, que se caracterizaron por un intervalo de valores de WAC y WRC. Se cortaron seis muestras de tamaño esencialmente igualitario de 2 cm x 2 cm de cada uno de los materiales de BC sin tejer y se obtuvieron los valores de WAC y WRC de manera independiente para cada una de las seis muestras de cada una de las seis muestras de cada uno de los materiales de BC sin tejer. Para cada muestra, se calcularon la media y la desviación estándar de WRC y WAC. Las Tablas 1 y 2 muestran la calidad y la homogeneidad de los materiales de la BC sin tejer en vista a las desviaciones estándar (SD) por debajo de ± 5 % para ambos valores característicos del material.

Tabla 1: Media de la capacidad de absorción de agua y desviaciones estándar correspondientes de diferentes materiales de BC sin tejer (n = 6 muestras para cada material)

| Material | Media de WAC | SD de WAC |
|---|---|---|
| Material 1 | 9,827 | 358 |
| Material 2 | 7,100 | 292 |
| Material 3 | 6,644 | 241 |

Tabla 2: Media de la capacidad de retención de agua y desviaciones estándar correspondientes de diferentes materiales de BC sin tejer (n = 6 muestras para cada material)

| Muestra | Media de WRC | SD de WRC |
|---|---|---|
| Material 1 | 832 | 17 |
| Material 2 | 798 | 24 |
| Material 3 | 719 | 22 |

Ejemplo 4

Se ensayó la influencia del recubrimiento del vaso de cultivo con una tapa en la evaporación del agua del vaso de cultivo bajo condiciones de flujo de aire laminar a una temperatura de 28ºC. Los resultados se muestran en la tabla 3. Se puede ver que recubrir el vaso de cultivo con una tapa reduce la cantidad de agua que se evapora del vaso de cultivo por un factor de casi 50.

Tabla 3: Evaporación de agua en L por $m^2$ de vaso de cultivo por día a T = 28ºC bajo condiciones de flujo de aire laminar

| Ensayo | Evaporación [L/($m^2$·d)] |
|---|---|
| Ensayo 1 (vaso de cultivo sin cubrir) | 4,9 |
| Ensayo 2 (vaso de cultivo cubierto) | 0,1 |

**REIVINDICACIONES**

1. Método para producir celulosa sin tejer sintetizada de manera bacteriana (BC), el método comprende las etapas de

a) Sintetizar BC mediante incubación de un cultivo bacteriano en un vaso de cultivo, en donde el cultivo bacteriano comprende un medio de cultivo líquido y la bacteria que sintetiza BC,

b) Añadir opcionalmente medio de cultivo fresco o reciclado y/o eliminar el medio de cultivo consumido durante la incubación,

c) Extraer del vaso de cultivo la BC sin tejer producida que tiene un espesor medio de al menos 0,5 mm,

en donde al menos durante la etapa a) la atmósfera gaseosa sobre el cultivo bacteriano se mantiene a una temperatura que es como máximo 10 K por debajo de la temperatura más alta del medio de cultivo en el vaso de cultivo dentro de una distancia de la superficie de contacto de la BC y la atmósfera gaseosa de 0 a 2 cm medidos en perpendicular a la superficie de contacto y en donde al menos durante la etapa a) la atmósfera gaseosa sobre el cultivo bacteriano se mantiene a una humedad relativa de al menos el 70% dentro de una distancia de la superficie de contacto de la BC y la atmósfera gaseosa de 0 a 2 cm medidos en perpendicular a la superficie de contacto.

2. Método según la reivindicación 1, en donde la síntesis de BC en el vaso de cultivo continúa durante la extracción del vaso de cultivo de la BC sin tejer producida que tiene un espesor medio de al menos 0,5 mm y en donde la BC sin tejer no acabada permanece en el vaso de cultivo y se separa de la BC sin tejer que se extrae, el método comprende además las siguientes etapas:

d) Continuación de la síntesis de BC en el vaso de cultivo mediante continuación de la incubación del cultivo bacteriano en el vaso de cultivo,

e) Añadir opcionalmente medio de cultivo fresco o reciclado y/o eliminar el medio de cultivo consumido durante la incubación,

f) Extraer del vaso de cultivo la BC sin tejer producida que tiene un espesor medio de al menos 0,5 mm, en donde la síntesis de BC continúa opcionalmente durante la extracción y en donde opcionalmente la BC sin tejer no acabada, en donde el espesor medio deseado no se ha conseguido aún, permanece en el vaso de cultivo y se separa de la BC sin tejer que se extrae, y

g) Opcionalmente repetir las etapas d) a f) al menos una vez.

3. Método según la reivindicación 1 o 2, en donde la temperatura del medio de cultivo es de 20ºC a 40ºC, preferiblemente de 25ºC a 33ºC.

4. Método según al menos una de las reivindicaciones precedentes, en donde al menos durante las etapas a) y/o d) la atmósfera gaseosa sobre el medio de cultivo se mantiene a una temperatura que es como máximo 10 K, preferiblemente como máximo 5 K, por debajo de la temperatura del medio de cultivo en el vaso de cultivo y/o a una humedad relativa de al menos 70%, preferiblemente al menos 95%, dentro de una distancia de la superficie de contacto de la BC y la atmósfera gaseosa de 0 a 5 cm medidos en perpendicular a la superficie de contacto.

5. Método según al menos una de las reivindicaciones precedentes, en donde el vaso de cultivo se recubre con un recubrimiento.

6. Método según al menos una de las reivindicaciones 2 a 5, en donde la BC sin tejer no acabada en donde no se ha conseguido aún el espesor medio deseado se separa de la BC sin tejer extraída mediante fluido de corte.

7. Método según al menos una de las reivindicaciones precedentes, en donde la BC sin tejer producida se extrae del vaso de cultivo en la etapa c) después de al menos tres y como máximo diez días de incubación.

8. Método según al menos una de las reivindicaciones 2 a 7, en donde la síntesis de BC en el vaso de cultivo se continúa en la etapa d) mediante continuación de la incubación del cultivo bacteriano en el vaso de cultivo durante al menos 12 horas y como máximo 100 horas.

9. Método según al menos una de las reivindicaciones precedentes, en donde el método comprende además la etapa de esterilizar la BC sin tejer mediante esterilización con haz de electrones posterior a la etapa c) y/o f).

.

10. La celulosa sin tejer sintetizada de manera bacteriana (BC) producida mediante el método de al menos una de las reivindicaciones 1 a 9, la BC sin tejer se caracteriza mediante la desviación estándar de la capacidad de absorción de agua (WAC) y/o la capacidad de retención de agua (WRC) es de como máximo 15% del valor medio de WAC o WRC correspondiente, respectivamente, en donde el valor medio y la desviación estándar se determinan a partir de como máximo 25 valores medidos independientemente y en donde los valores medidos independientemente se obtienen mediante el corte de muestras de tamaños esencialmente iguales de 2 cm x 2 cm de la BC sin tejer y determinando el valor de WAC y/o WRC de cada muestra de manera independiente.

11. La BC sin tejer según la reivindicación 10, en donde la BC sin tejer tiene un espesor medio de al menos 0,5 mm y como máximo 8 mm.

12. El uso de BC sin tejer según al menos una de las reivindicaciones 10 y 11 en productos del campo dermatológico, médico, farmacéutico, diagnóstico, nutricional, cosmético, técnico y de equipos protectores.

13. Aparatos para producir BC sin tejer, en donde el aparato comprende:

    A) Al menos un vaso de cultivo,

    B) Medios para añadir medio de cultivo fresco o reciclado y/o eliminar medio de cultivo consumido del vaso de cultivo, y

    C) Medios para extraer del vaso de cultivo la BC sin tejer producida,

    en donde el vaso de cultivo tiene una forma sustancialmente rectangular con una longitud de al menos 100 cm y una anchura de al menos 10 cm, en donde el aspecto de la proporción de la longitud para la anchura es de 1,5 a 10000 y en donde el aparato comprende medios para mantener la atmósfera gaseosa sobre el medio de cultivo a una temperatura y humedad relativa predeterminada dentro de una distancia del medio de cultivo de hasta 2 cm, en donde la temperatura predeterminada se desvía de la temperatura del medio de cultivo en el vaso de cultivo en como máximo ± 10 K y la humedad relativa predeterminada es al menos del 70%.

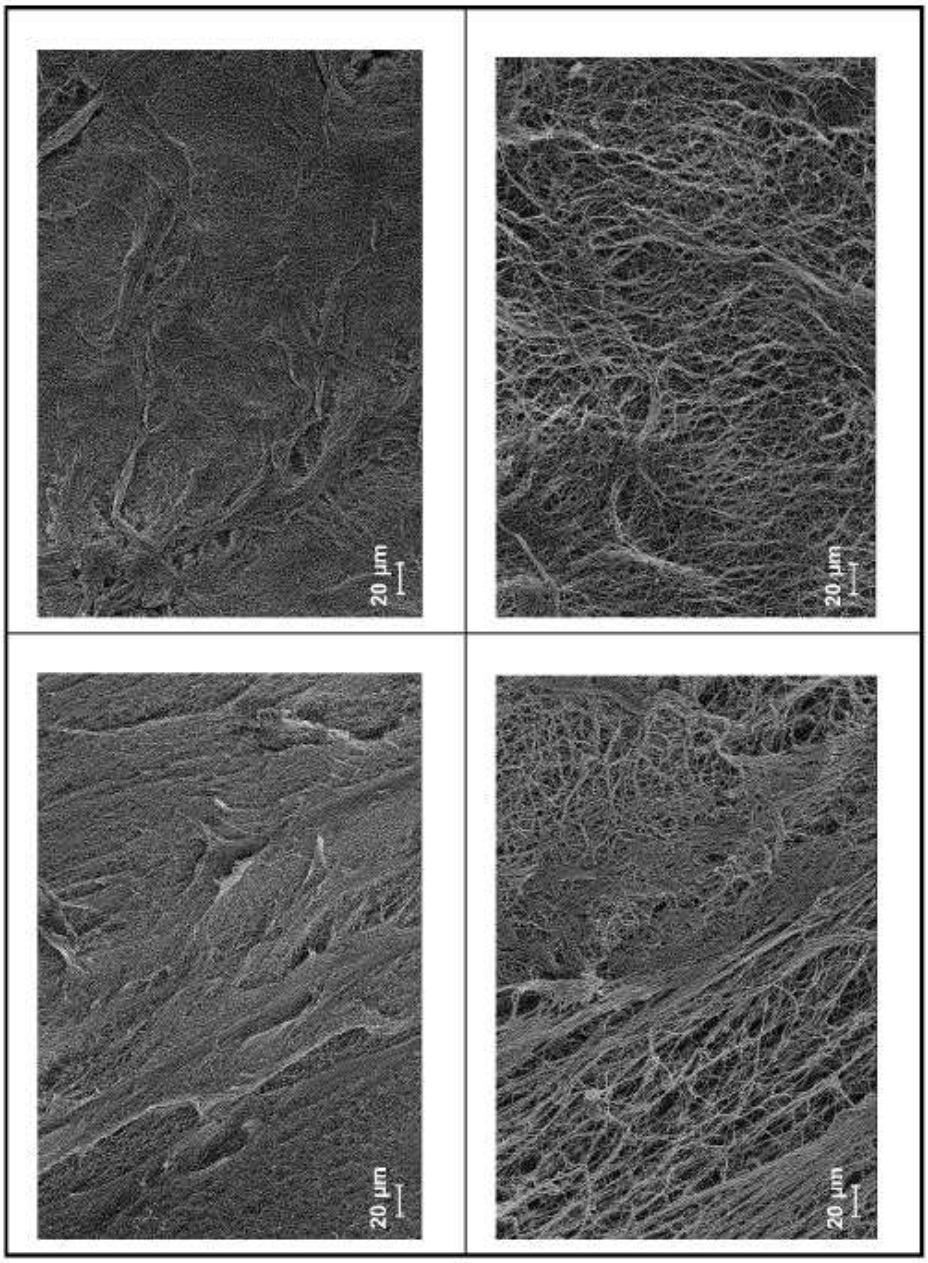



Figura 1

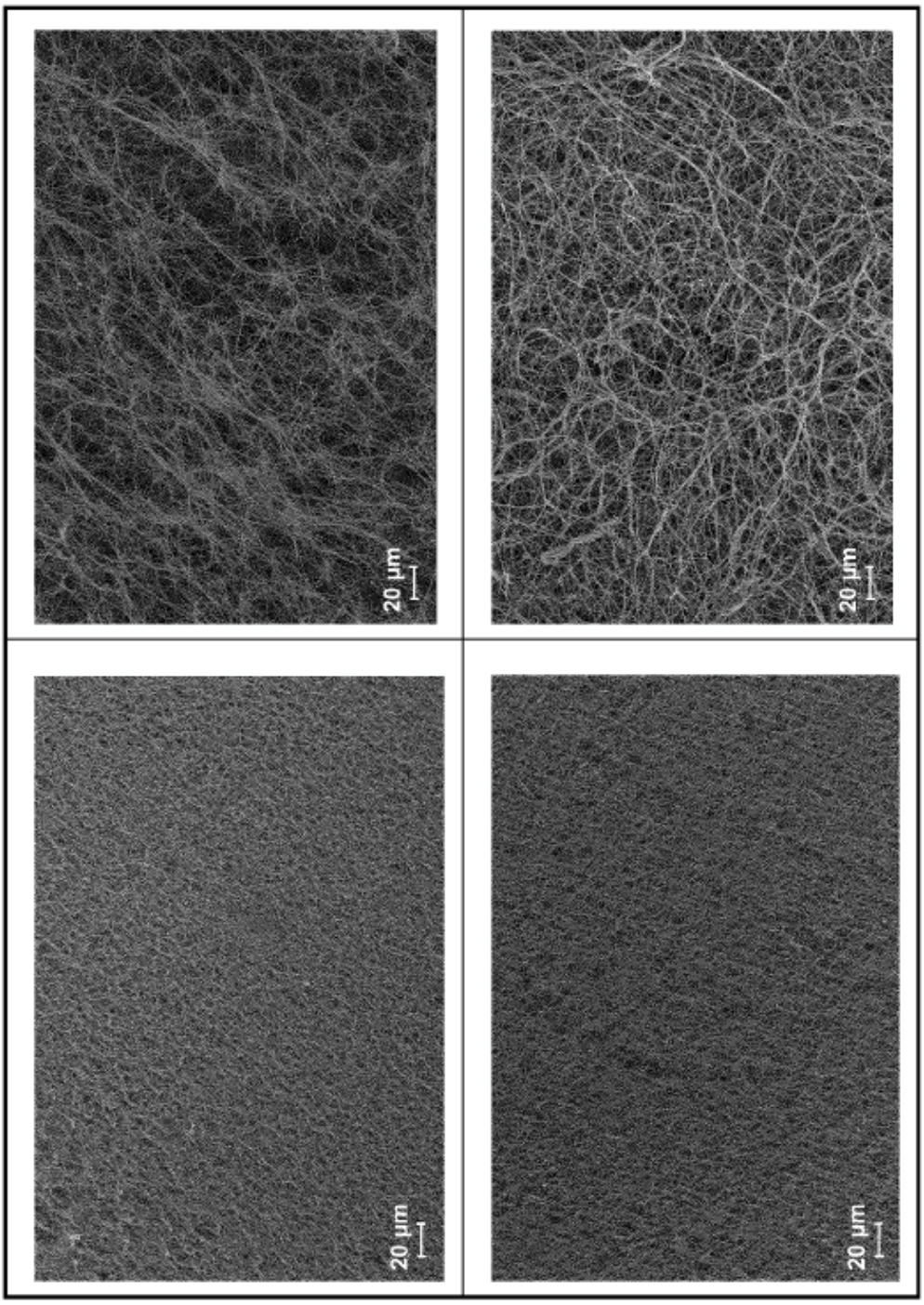



Figura 2