

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 396 654**

51 Int. Cl.:

C12N 15/09 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.06.2006 E 06765966 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.08.2012 EP 1907542**

54 Título: **Producción de metabolitos secundarios empleando membranas capilares**

30 Prioridad:

30.06.2005 ZA 200505315

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.02.2013

73 Titular/es:

**QUORUS BIOTECH (PROPRIETARY) LIMITED
(100.0%)**

**Unit 23A, Waverley Business Park, Kotzee Road
Mowbray 7700, ZA**

72 Inventor/es:

**LEUKES, WINSTON DANIEL;
FRASER, SHEENA JANET y
EDWARDS, WADE**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 396 654 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Producción de metabolitos secundarios empleando membranas capilares

5 **Campo de la memoria**

Esta invención se refiere a la producción de metabolitos secundarios o productos recombinantes. En concreto, se refiere a procedimientos para producir metabolitos secundarios y/o productos recombinantes en condiciones de oxígeno limitado o condiciones anaerobias.

10

Antecedente de la memoria

Se han descrito ampliamente los desafíos asociados con los cultivos celulares de alta densidad; en dónde el interés principal se ha puesto de forma típica en mejorar las propiedades de transferencia de material de los biorreactores mediante la integración de módulos de fibra hueca en los procesos de fermentación típicos o atípicos como una forma de concentrar las células mientras se vuelve a cargar con nutrientes y/u oxígeno el reactor de cultivo, de forma que se puedan conseguir y suspender mayores densidades celulares. A modo de ejemplo, Cracauer y col. (US4804628) describen un biorreactor de fibra hueca en el que los nutrientes se suministran desde luces capilares a las células suspendidas en el espacio extracapilar (ECS). A su vez, el ECS está conectado a una cámara de expansión con un sistema para presurizar un gas (aire u oxígeno), de forma que la suspensión de células se hace circular varias veces, de forma alternativa y selectiva, entre el biorreactor y la cámara de expansión, garantizando de esta forma que las células se mantienen como una suspensión homogénea, se eliminan los gradientes de nutrientes, y se recupera el oxígeno. Por el contrario, Inloes y col. (1983) describen las primeras etapas del desarrollo de un sistema biorreactor de fibra hueca como un biorreactor autocontenido, en el que células de *Escherichia coli* con crecimiento activo se encuentran atrapadas en el interior de la matriz de membrana microporosa, recuperándose los nutrientes por difusión desde la luz de la membrana, y con suministro de aire u oxígeno humidificado y esterilizado en la superficie capilar. Sin embargo, este sistema no consigue el confinamiento de los microorganismos inmovilizados a densidades celulares elevadas y la recogida eficaz de un producto del sistema exento de células.

15

20

25

30 Metabolitos secundarios

La mayor parte de tecnologías usadas para la producción de productos naturales se han desarrollado para mejorar la transferencia de materia del oxígeno en fermentaciones aerobias. Se han aprovechado pocas fermentaciones anaerobias en su capacidad de producir metabolitos secundarios. Las fermentaciones anaerobias se han desarrollado principalmente para el tratamiento de aguas residuales y procesos biológicos tales como la producción de ácidos orgánicos o de etanol.

35

Los metabolitos secundarios se producen por diferenciación en cultivo en medio sólido y/o la fase estacionaria de un cultivo en medio líquido. Se producen de forma típica en un cultivo en medio líquido sumergido por lotes o en modo de lote alimentado. Los casos que se llevan a cabo de forma de cultivo en lote son:

40

1. Se introduce un inóculo en el biorreactor preparado. De forma típica, se produce una fase de latencia mientras el organismo o cultivo se adapta a su entorno.
2. Una vez que los organismos comienzan a crecer, de forma típica por bipartición, sigue una fase exponencial, en la que la concentración de la biomasa del cultivo aumenta rápidamente mientras se consumen los nutrientes. Se acumulan los metabolitos primarios y los productos residuales metabólicos.
3. Eventualmente, los nutrientes del cultivo se agotan y los productos residuales se acumulan de forma que el cultivo deja de aumentar su concentración de biomasa. Esta fase sin crecimiento se denomina fase estacionaria. Es en este periodo cuando se producen los metabolitos secundarios. El cultivo en lote alimentado implica la adición de nutrientes a bajo nivel y/o la dilución de productos residuales para extender la fase estacionaria.

45

50

Entre los factores que afectan la productividad volumétrica de los biorreactores en lo que respecta a la producción de metabolitos secundarios se incluyen: entorno de baja cizalladura, elevada concentración de biomasa, diferenciación del cultivo, la presencia de un sustrato sólido para inmovilizar la biomasa, una fase de producción ampliada y una buena transferencia de materia de los nutrientes. Aunque se han desarrollado sistemas para la producción mejorada de concentración de biomasa en condiciones de cultivo aerobio, la producción eficaz de concentración de biomasa en condiciones anaerobias se ha ignorado en gran medida.

55

60

La concentración de biomasa de microorganismos anaerobios tiene una importancia fundamental en las ciencias de la vida. Como los microorganismos anaerobios habitan de forma típica nichos ecológicos poco usuales, representan una fuente interesante de metabolitos con tolerancias ambientales poco usuales y metabolitos nuevos para cribado de fármacos. Además, numerosos organismos patógenos proliferan en condiciones anaerobias y los metabolitos que producen son indicadores valiosos de los mecanismos de señalización celular, factores de patogenicidad, marcadores de identificación o indicadores de dianas de fármacos potenciales. De esta forma, un procedimiento

65

eficaz para producir metabolitos secundarios, concretamente uno que permita la formación de biopelícula y diferenciación del cultivo, tiene un valor considerable en la industria de las ciencias de la vida.

Si se produce un desarrollo significativo en las estrategias de optimización de medios para el cultivo de microorganismos en condiciones limitantes de oxígeno, es posible conseguir una elevada densidad celular. Los organismos anteriormente examinados en condiciones aerobias se pueden cribar ahora respecto de la producción de productos naturales que se pueden inducir en condiciones limitantes de oxígeno, tales como la enzima inhibidora de tumores L-asparaginasa producida por *Serratia marcescens* (Heinemann, 1970) o la producción mejorada de surfactina en *Bacillus subtilis* (Davies y col. 1999)

Productos recombinantes

Algunos productos industrialmente importantes se producen mediante microorganismos, productos tanto naturales como recombinantes. El mercado de productos recombinantes tanto para la industria farmacéutica como para otras industrias ha aumentado en los últimos años. Los productos recombinantes, incluyendo pero sin limitación, enzimas, hormonas, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, partículas análogas a virus, péptidos, fragmentos de ADN y ARN, se producen mediante una variedad de sistemas de expresión microbianos. Los productos también pueden incluir sustancias químicas producidas por los productos de expresión de enzimas recombinantes sintéticas.

Se han diseñado mediante ingeniería genética una variedad de hospedadores de expresión para optimizar la producción, solubilidad y excreción de los productos recombinantes. Los hospedadores de expresión incluyen una gama de especies de bacterias, hongos, células vegetales, células de insecto, protozoos y células de mamífero. La mayor parte de sistemas de expresión son aerobios, lo que requiere un aporte considerable de energía para mantener una elevada transferencia de materia de oxígeno en los biorreactores de cultivo sumergido. La mayor parte de la tecnología de bioprocesos se centra en obtener concentraciones realmente muy elevadas de células en el biorreactor, de forma típica en el modo de cultivo de lote alimentado. La elevada concentración inicial del sustrato y la fluidez del cultivo son los obstáculos principales para obtener un crecimiento con alta densidad celular. De forma rutinaria, una vez aparece la suficiente biomasa, se induce al hospedador de producción a expresar el producto recombinante de interés. Esta inducción es de forma típica una molécula que se añade en el momento adecuado, o es un metabolito producido por el hospedador de producción como producto residual, un metabolito primario o secundario. La estrategia de producir proteínas recombinantes una vez el cultivo ha alcanzado la fase estacionaria es muy habitual porque:

- 1) Permite la producción de productos que son tóxicos para el organismo productor.
- 2) La productividad volumétrica mejora si la concentración de biomasa en el reactor es muy elevada.
- 3) Los precursores de la producción del producto son de forma típica metabolitos primarios, que se acumulan durante la fase primaria del crecimiento.

Frecuentemente es difícil temporalizar la adición de los inductores de la proteína recombinante de una forma óptima para que los inductores se añadan cuando el cultivo alcance la fase estacionaria, y no demasiado pronto ni demasiado tarde. Esto es especialmente difícil cuando se llevan a cabo diferentes cultivos en paralelo en condiciones diferentes durante los experimentos de optimización. De esta forma se han desarrollado sistemas que "autoinducen" la expresión, que se han diseñado mediante ingeniería genética para cambiar automáticamente a la expresión de la proteína recombinante cuando el cultivo alcanza la fase estacionaria (Studier, 2005).

Aunque la mayor parte de hospedadores de expresión de proteínas recombinantes son organismos aerobios, la elevada densidad del cultivo se ve limitada por las limitaciones a la transferencia de materia del oxígeno. De esta forma, se ha mostrado interés en desarrollar hospedadores de expresión tales como una bacteria acidoláctica (BAL) capaz de un crecimiento anaerobio.

Se ha considerado que las BAL son muy interesantes como hospedadores de expresión de proteínas recombinantes. Esto se debe a que las BAL son Gram positivas y por tanto más adecuadas para la secreción de proteínas y menos propensas a generar componentes de membrana inmunógenos que a menudo contaminan los productos procedentes de los hospedadores de expresión Gram negativos. Son anaerobios facultativos, por lo no se aplican las limitaciones de la transferencia de materia del oxígeno que limitan el crecimiento que de forma típica aparecen en el cultivo sumergido. Algunos hospedadores de expresión BAL también se han desarrollado con "autoinducción" de la expresión de la proteína recombinante al inicio de la fase estacionaria (Kuipers, y col., 1997; de Vos, 1999). Se enumeran algunos ejemplos a continuación.

- 1) Inducción por nisina: nisina es un metabolito secundario y una molécula de señalización celular producida por las BAL. Se produce sin embargo cuando el cultivo está maduro y en la fase estacionaria, y autorregulará la inducción de la producción de proteína recombinante en el momento oportuno. (Xu Xia Zhou y col. 2006)

2) Inducción por un pH bajo, acumulación de ácido láctico y/o inicio de la fase estacionaria. El sistema p170 para la expresión de proteínas recombinantes de *Lactococcus* sp. se induce por acumulación de ácido láctico/lactato, un producto residual metabólico que se acumula durante la fase de crecimiento de las BAL, dando como resultado una disminución en el pH que puede ralentizar el crecimiento lo suficiente para inducir el inicio de la fase estacionaria.

5 Además de inducirse por un aumento en la concentración de ácido láctico/lactato, el sistema también se induce por el inicio de la fase estacionaria ocasionada por la limitación de nutrientes. De esta forma, este sistema autorregula la inducción de la expresión del producto de proteína en el momento oportuno. (Madsen y col. 1999).

10 Un problema que surge con este sistema en cultivo discontinuo es que la fase de producción es de forma típica bastante corta debido a una sobreacumulación típica de productos metabólicos residuales o tóxicos debido a que un estrés de nutrientes excesivo mata el cultivo. Así, las tecnologías que permitan la eliminación continua de residuos y la ampliación de la fase estacionaria de al menos parte del cultivo tendrán un impacto positivo sobre el rendimiento de los sistemas de producción de proteína recombinante.

15 El hospedador de expresión bacteriano más usado, *Escherichia coli*, se cultiva principalmente en cultivos de alta densidad celular Aunque la tasa específica de crecimiento de este organismo es mayor en condiciones aerobias, puede crecer anaeróbicamente. Se han diseñado mediante ingeniería genética sistemas de expresión en *E. coli* para producir productos difíciles de expresar, tóxicos y/o insolubles. Las tecnologías de fermentación que permiten la producción y extracción continuas de productos que son insolubles a mayores concentraciones o que son tóxicos para el organismo hospedador ofrecen ventajas sobre las tecnologías tradicionales de cultivos sumergidos.

Definiciones

25 Cualquier referencia realizada en la presente memoria a un "microorganismo" debe interpretarse como que significa una referencia a los microorganismos que incluye bacterias y hongos que son capaces de crecer y metabolizar en condiciones de oxígeno limitado o condiciones anaerobias.

30 Cualquier referencia realizada en la presente memoria a una "fase estacionaria" debe interpretarse como que significa un periodo de crecimiento limitado o de crecimiento y muerte sustancialmente en equilibrio que de forma típica sucede tras la fase de crecimiento primario en un cultivo por lotes o cultivo continuo de microorganismos.

35 Cualquier referencia realizada en la presente memoria a una "proteína recombinante" es sinónimo de "producto recombinante" y debe interpretarse como que significa cualquier producto recombinante o el producto del mismo si se trata de un producto biosintético, homólogo o heterólogo con respecto al hospedador de expresión, cuya producción se puede inducir mediante algún mecanismo al inicio de –o durante- la fase estacionaria. El producto se puede tanto secretar por el hospedador de expresión al ambiente extracelular, o bien retenerse intracelularmente. Los productos recombinantes no se limitan a las proteínas.

40 Cualquier referencia realizada en la presente memoria a una "solución nutriente" debe interpretarse como que significa una solución líquida que contiene uno o más nutrientes necesarios para el crecimiento de los microorganismos que incluye al menos un nutriente que es limitante del crecimiento. La solución nutriente puede también llevar un inductor necesario para iniciar la expresión de los productos recombinantes.

45 Cualquier referencia realizada en la presente memoria a un "inductor" debe interpretarse como que significa una sustancia química biológica o sintética incluida en la solución nutriente, o un producto biosintético producido por el hospedador de expresión inmovilizado durante el crecimiento y usado como un medio de regular la producción de proteínas recombinantes bajo el control de un promotor relevante que regula la expresión de dicha proteína recombinante.

50 Cualquier referencia realizada en la presente memoria a un "permeato" debe interpretarse como que significa la solución nutriente agotada o corriente de producto que ha atravesado la biopelícula y el sustrato y puede llevar producto secretado, productos metabólicos residuales y/o el resto de nutrientes no metabolizados por el microorganismo durante el paso de la solución nutriente a través de la biopelícula.

55 Compendio de la memoria

De acuerdo con un aspecto de la memoria, se proporciona un procedimiento de producción de metabolitos secundarios en condiciones de oxígeno limitado o de cultivo anaerobio, dicho procedimiento incluye:

60 proporcionar un sustrato poroso que tenga un primer lado y un segundo lado y que tenga una biopelícula de microorganismos unida al primer lado del mismo, configurándose el sustrato para permitir el paso de metabolitos secundarios a su través y para evitar el paso de células de microorganismos a su través; y

65 hacer que una solución nutriente fluya a través de la biopelícula y del sustrato en una dirección desde el primer lado del mismo al segundo lado del mismo en condiciones de oxígeno limitado o de cultivo anaerobio, a una velocidad

- que sea lo suficientemente baja para que se establezca un gradiente de nutriente a través de la biopelícula en el que la concentración del nutriente sea además relativamente mayor de la del sustrato y suficientemente elevada para sostener el crecimiento primario de los microorganismos y en el que la concentración del nutriente sea relativamente baja cerca del sustrato y lo suficientemente baja para inducir y sostener una fase estacionaria de los
- 5 microorganismos y dar lugar, por tanto, a que los microorganismos produzcan al menos un metabolito secundario, transportando el flujo de la solución nutriente a través del sustrato dicho metabolito secundario a través del sustrato, al segundo lado del mismo, en el que se puede recoger el metabolito secundario secretado, reteniéndose las células de los microorganismos procedentes de la biopelícula en el primer lado del mismo.
- 10 Por condiciones de oxígeno limitado o condiciones anaerobias, se entienden las condiciones en las que no hay oxígeno o no hay oxígeno sustancialmente presente. Sin embargo, se prevé que en algunas circunstancias, el procedimiento de la memoria pueda funcionar aún si se encuentran presentes bajas concentraciones de oxígeno.
- 15 Los microorganismos pueden ser un cultivo sustancialmente puro de una cepa de un microorganismo o un cultivo mixto de diferentes microorganismos. Los microorganismos se pueden seleccionar entre el grupo que consiste en *Clostridium* sp., *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Vibrio* sp., *Serratia* sp., *Rhodopseudomonas* sp., *Anaeromyxobacter* sp., *Desulphovibrio* sp., y *Candida* sp.
- 20 El procedimiento de producir el metabolito secundario se puede llevar a cabo a la temperatura comprendida en el intervalo de crecimiento y formación del producto de los microorganismos. El procedimiento de producción del metabolito secundario se puede llevar a cabo a una temperatura de 2 – 109° C, preferiblemente 20 – 32° C, por ejemplo, 30° C.
- 25 El procedimiento de producción del metabolito secundario se puede llevar a cabo a un pH inicial comprendido en el intervalo de crecimiento y de formación del producto de los microorganismos. El procedimiento de producción del metabolito secundario se puede llevar a cabo a un pH inicial de 1 – 13, preferiblemente de 5,5 – 8,5, por ejemplo, 7.
- 30 El procedimiento de producción del metabolito secundario se puede llevar a cabo durante tanto tiempo como la biopelícula o el cultivo permanezcan viables y productivos y no demasiado densos de tal manera que se evite el flujo del producto a través del sustrato. El procedimiento de producción del metabolito secundario se puede llevar a cabo durante un periodo de 1 – 30 días, preferiblemente 2 – 10 días, por ejemplo, 4 días.
- 35 El metabolito secundario se puede producir intracelularmente o extracelularmente por los microorganismos. Los metabolitos extracelulares secretados a partir de la biopelícula en la corriente del nutriente y recogidos en el permeato se pueden muestrear y extraer de forma continua, mejorando la estabilidad y la productividad volumétrica de dichos productos. Los metabolitos intracelulares secundarios se pueden extraer de las biopelículas mediante procedimientos de permeabilización de células, choque osmótico o lisis celular. Los procedimientos intracelulares extraídos se pueden separar a partir de la biomasa tratada filtrando el extracto a través del sustrato desde el primer lado al segundo lado por el mismo medio que se suministra la solución nutriente a la biopelícula y al permeato
- 40 eliminado procedente del biorreactor. Una elevada densidad celular de los cultivos de la biopelícula asegura un elevado rendimiento de la biomasa asociada a los metabolitos.
- 45 Se apreciará que el espesor de la biopelícula es dependiente del contenido de la solución nutriente y del tipo de microorganismo cultivado. La película debe ser lo suficientemente gruesa para establecer un gradiente de nutrientes a través de la biopelícula de tal manera que parte de la biopelícula experimente la privación de nutriente y penetre y sostenga el crecimiento de la fase estacionaria y la producción del metabolito secundario. La película puede tener un espesor de 0,1 – 10 mm, preferiblemente de 0,1 – 4 mm, por ejemplo, 3 mm.
- 50 El caudal de la solución nutriente procedente del primer lado al segundo lado, a través de la biopelícula y del sustrato debe ser tal que el microorganismo permanezca inmobilizado y se mantenga la productividad volumétrica óptima del metabolito secundario. Los caudales pueden ser de 0,01 – 10 volúmenes de solución nutriente por volumen del biorreactor.
- 55 De acuerdo con un aspecto adicional de la memoria, se proporciona un procedimiento de producción de al menos un producto recombinante en condiciones de oxígeno limitado o de cultivo anaerobio, cuyo procedimiento incluye: proporcionar un sustrato poroso que tenga un primer lado y un segundo lado y que tenga una biopelícula de microorganismos unida al primer lado de la misma, configurándose el sustrato para permitir el paso de producto recombinante a ay través y para evitar el paso de las células de los microorganismos a su través
- 60 y hacer que una solución nutriente fluya a través de la biopelícula y del sustrato en una dirección desde el primer lado del mismo al segundo lado del mismo en condiciones de oxígeno limitado o de cultivo anaerobio, a una velocidad que sea lo suficientemente baja para que se establezca un gradiente de nutriente a través de la biopelícula en el que la concentración de nutriente sea relativamente mayor además de la del sustrato y suficientemente elevada para sostener el crecimiento primario de los microorganismos y en el que la concentración de nutriente sea relativamente
- 65 más baja próxima a la del sustrato y suficientemente baja para introducir y sostener una fase estacionaria de los

microorganismos para inducir por tanto la producción de al menos un producto recombinante por los microorganismos, el flujo de la solución nutriente a través del sustrato que transporta el producto recombinante a través del sustrato al segundo lado del mismo, en el que se puede recoger el producto recombinante, reteniéndose las células de los microorganismos procedentes de la biopelícula en el primer lado del mismo.

- 5 Por condiciones de oxígeno limitado o condiciones anaerobias se entiende condiciones en las que no se encuentra oxígeno sustancialmente presente durante el crecimiento de la fase estacionaria. Sin embargo, se prevé que en algunas circunstancias el procedimiento de la memoria puede funcionar aún si se encuentran presentes bajas concentraciones de oxígeno
- 10 La inducción se puede producir de diversas maneras tales como mediante agotamiento del nutriente, adición de una molécula inductora, acumulación de producto metabólico primario o metabolito secundario producido en condiciones limitantes de nutriente, autoinducción y similares. En otras palabras, el procedimiento puede usar la desrepresión y/o la inducción de la expresión del gen recombinante. La inducción puede producirse a través de la adición de una molécula inductora de la solución nutriente o a través de la acumulación de un producto metabólico primario o del
- 15 metabolito secundario producido en condiciones limitantes del nutriente, de tal manera que el flujo de la solución nutriente a través del sustrato y la biopelícula transporte dicho inductor a través de la biopelícula desde el primer lado al segundo lado, para inducir, por tanto, la producción de dicho producto recombinante por los microorganismos.
- 20 El inductor puede ser cualquier molécula adecuada tal como L-arabinosa) (0,00002 - 2 %) isopropil b-D-tiogalactósido (IPTG) (0,01-1 mM) o metanol (0,5 - 1,5 %) que interactúa con un promotor específico con el que se diseña mediante ingeniería genética un sistema de expresión recombinante. Se puede variar la concentración del inductor con el fin de optimizar la expresión de los productos de la proteína recombinante plegados correctamente.
- 25 El microorganismo puede ser un cultivo sustancialmente puro de una cepa de un microorganismo o un cultivo mixto de diferentes microorganismos. El microorganismo se puede seleccionar entre el grupo que consiste en, pero no se limita a *Lactococcus lactis*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pichia sp.*, *Candida sp.*, *Hansenula polymorpha* y *Sacharomyces cerevisiae*.
- 30 El procedimiento de producción del producto recombinante se puede llevar a cabo a una temperatura comprendida en el intervalo de crecimiento y formación del producto del microorganismo. El procedimiento de producción del producto recombinante se puede llevar a cabo a una temperatura de 2 – 109° C, preferiblemente 20 – 40° C, por ejemplo, 30° C.
- 35 Para los cultivos de *Lactococcus lactis* el procedimiento se puede llevar a cabo a una temperatura de 25 – 32° C. La temperatura de crecimiento óptima es 30° C. Sin embargo, temperaturas de crecimiento inferiores tales como de 25° C son limitantes del crecimiento y pueden alargar la duración del procedimiento de producción del producto recombinante.
- 40 Para los cultivos de *Escherichia coli*, el procedimiento se puede llevar a cabo a una temperatura de 30 – 40° C. La temperatura de crecimiento óptima es 37° C. sin embargo, temperaturas de crecimiento inferiores tales como de 30° C son limitantes del crecimiento y se pueden utilizar para alargar la duración del procedimiento de producción del producto recombinante.
- 45 El procedimiento de producción del producto recombinante se puede llevar a cabo a un pH inicial comprendido en el intervalo de crecimiento y formación del producto del microorganismo. El procedimiento de producción del producto recombinante se puede llevar a cabo a un pH inicial de 1 – 13, preferiblemente de 5,5 – 8,5, por ejemplo, 7.
- 50 Para los cultivos de *Lactococcus lactis*, el procedimiento se puede llevar a cabo a un pH inicial de 5,5 – 8,5.
Para los cultivos de *Escherichia coli*, el procedimiento se puede llevar a cabo a un pH inicial de 5,5 – 8,5.
- El procedimiento de producción del producto recombinante se puede llevar a cabo durante tanto tiempo como la biopelícula o el cultivo permanezcan viables y productivos y no demasiado densos de tal manera que se evite el flujo
- 55 del producto a través del sustrato. El procedimiento de producción del producto recombinante se puede llevar a cabo durante un periodo de 1 - 30 días, preferiblemente 2 - 10 días, por ejemplo, 4 días.
- Para *Lactococcus lactis*, el procedimiento se puede llevar a cabo durante un periodo de 4 días.
- 60 Para *Escherichia coli*, el procedimiento se puede llevar a cabo durante un periodo de 1 día.
- El producto recombinante se puede producir intracelularmente o extracelularmente por los microorganismos. El producto recombinante se puede recoger del primer lado si se secreta por los microorganismos o se puede cosechar de la biopelícula si se retiene intracelularmente por los microorganismos. Los metabolitos intracelulares se pueden
- 65 retener en el interior del citoplasma o secretarse al espacio periplásmico y extraerse utilizando procedimientos de

lisis celular o de permeabilización celular tales como el choque osmótico.

Se puede hacer pasar la solución nutriente a través de la biopelícula y el sustrato a un caudal que sea suficiente para sostener e inmovilizar el microorganismo a la vez que se mantiene un gradiente del nutriente a través de la biopelícula. Los caudales pueden diferir dependiendo del contenido de nutriente de la solución nutriente y o del tipo de microorganismo cultivado. Los caudales pueden variar desde 0,001 – 10 volúmenes de solución nutriente por volumen del reactor por hora.

El espesor de la biopelícula puede depender del contenido de nutriente de la solución nutriente y del tipo de microorganismo cultivado. La biopelícula puede tener un espesor de 0,1 – 10 mm, por ejemplo, 1 – 3 mm para *L. lactis*, y deben limitarse de tal manera que el caudal de la solución nutriente se mantenga en un intervalo adecuado para que la biopelícula o el cultivo permanezcan viables y productivo y no sean demasiado gruesos de tal manera que se evite el flujo del producto a través del sustrato.

A no ser que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen el mismo significado que una persona normalmente experta en la técnica a la cual esta memoria pertenece entiende comúnmente. Se describen a continuación los procedimientos preferidos, aunque se pueden utilizar procedimientos similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria en la práctica o el ensayo de la presente memoria.

Breve descripción de los dibujos

Se describen a partir de ahora en la presente memoria las características adicionales de la memoria por medio de un ejemplo no limitante de la memoria, con referencia a y tal como se ilustra en los dibujos de los diagramas que la acompañan. En los dibujos;

La Figura 1 muestra una vista en alzado esquemática de un aparato de acuerdo con la memoria;

La Figura 2 muestra una vista en alzado esquemática de una porción de un sustrato poroso del aparato de la Figura 1, revestido en un lado externo del mismo con una biopelícula y que ilustra un régimen de flujo de una solución nutriente a través de la biopelícula;

La Figura 3 muestra una vista en planta de una sección esquemática del sustrato poroso de la Figura 2, seccionada a lo largo de la línea III-III de la sección de la Figura 2;

Las Figuras 4A-D muestran diagramas de bloque esquemáticos que ilustran diferentes opciones de regímenes de flujo de fluidos para el suministro de una solución nutriente al aparato de la Figura 1 y para la recogida del producto procedente del anterior;

Las Figuras 5A y 5B son cromatogramas de HPLC que muestran la separación de isómeros de surfactina detectados en el patrón de surfactina de Fluka (A) y en una muestra típica producida por *Bacillus subtilis* en condiciones de oxígeno limitado utilizando un biorreactor de membrana monofibra (B);

Las Figuras 6A y 6B son gráficas de la producción de β -lactamasa por *L. lactis* PRA290 utilizando el aparato de la Figura 1. Los biorreactores se hicieron funcionar utilizando una solución nutriente que contenía cualquiera de un tampón de fosfato de sodio 200 mM (A) o un tampón de fosfato de sodio 400 mM (B); y

Las Figuras 7A y 7B son fotografías de geles SDS-PAGE que muestran la producción de calmodulina por *E. coli* pBAD/gIII/calmodulina en biorreactores cultivados con medio de crecimiento que contiene 0 % (control), 0,00002 %, 0,002 % o 2 % de la molécula inductora, L-arabinosa. (A) Extractos de proteínas preparados a partir de biopelículas mediante el procedimiento de choque osmótico. (B) extractos de proteínas preparados mediante análisis directo de biopelículas en un tampón de muestra desnaturizada o de la fracción soluble de la lisis celular.

Descripción de las realizaciones preferidas

Metabolitos secundarios:

Con referencia a las Figuras 1 a 4 de los dibujos, un aparato para la producción de un metabolito secundario en condiciones de oxígeno limitado o condiciones anaerobias, se designa generalmente mediante el número de referencia 10. El aparato está en la forma de un biorreactor 10 que se muestra en la Figura 1 de los dibujos a una escala de laboratorio, sin embargo se apreciará que los principios plasmados en el biorreactor se pueden aplicar en una escala ampliada o una realización comercial.

El biorreactor 10 incluye una membrana capilar 12 de fibra cerámica hueca estando introducidos los extremos de la membrana en inserciones plásticas 14, 16 con epoxi 18, que comprende una inserción cerámica. Debe apreciarse que se pueden usar también otras resinas o cierres herméticos mecánicos. Un alojamiento o carcasa del reactor 20

de vidrio se dispone coaxialmente con la membrana capilar 12 y va provisto de tapones 22 y 23 en los extremos roscados sobre el alojamiento 20 de vidrio. El alojamiento 20 incluye una entrada de alimentación 26 para introducir una solución de alimentación del nutriente líquido para microorganismos en el espacio 24 entre el sustrato poroso y el alojamiento y una entrada de inoculación 25 para introducir un inóculo en el alojamiento para unirse a la membrana 12. El alojamiento incluye además una salida de la alimentación 27 para descargar la solución de alimentación desde el alojamiento. La inserción cerámica 12, 14, 16 incluye una salida del producto 28 para descargar permeatos desde el alojamiento.

En uso, se establece una biopelícula 32 sobre una superficie externa 30 de la membrana capilar 12. Esto se consigue filtrando una spora o inóculo vegetativo de un microorganismo deseado a través de la membrana capilar 12 y drenando cualquier permeato que salga de la luz 34 y a través de la salida 28. La luz 34 está, de esta manera, en comunicación de fluido con la salida 28. El inóculo se inmoviliza de esta manera sobre la superficie de la membrana 30. La membrana 12 tiene una piel 36 porosa relativamente delgada en el interior y una estructura 38 con huecos, externamente sin piel, gruesa, en forma de dedo que radia hacia el exterior de la piel 36. Normalmente, la membrana 12 tiene un diámetro externo de aproximadamente 2 mm.

Se introduce una solución nutriente adecuada para el microorganismo en el alojamiento mediante la entrada de nutriente 26 anterior. Se hizo que la solución nutriente fluyera a través de la membrana 12 en una dirección desde el lado externo de la membrana hasta el lado interno de la misma. Para la producción de los metabolitos secundarios es fundamental el concepto de privación de nutriente, que estresa al microorganismo, y controla de esta manera la producción de metabolitos secundarios. Esto se consigue en el biorreactor 10 de biopelícula inmovilizada por membrana mediante la producción de gradientes radiales de concentración de nutrientes a través de la biopelícula 32. Como resultado, la concentración de nutriente en la superficie externa expuesta de la biopelícula 32 es elevada, mientras que la concentración de nutriente en la interfase 30 membrana / biopelícula es baja. En las Figuras 2 y 3 de los dibujos, para fines de ilustración, se designa una zona de elevada concentración del nutriente mediante el número de referencia I y se designa una zona de baja concentración del nutriente mediante el número de referencia II. En la zona I la concentración del nutriente es lo suficientemente elevada para sostener el crecimiento primario de los microorganismos, mientras que en la zona II la concentración del nutriente es lo suficientemente baja para producir la privación de nutriente, que estresa a los microorganismos, y por tanto para inducir y sostener una fase estacionaria de los microorganismos. Se establece una población de células en crecimiento y reproducción en la biopelícula en la superficie externa expuesta de la membrana, mientras que se producen metabolitos secundarios durante periodos ampliados en la zona II de la biopelícula. En la Figura 3, un gráfico "A" representa gráficamente el nivel de concentración del nutriente (eje y) frente a la distancia desde la superficie de la membrana (eje x).

La porosidad de la membrana 12 es tal que permite el paso de los metabolitos secundarios a través de la membrana a la luz 34, mientras que se evita que las células de los microorganismos pasen a través de la membrana. Como resultado, los metabolitos secundarios producidos en la zona II de la biopelícula se transportan hacia el interior en la luz 34 de la membrana por el flujo de la solución nutriente desde el lado externo de la membrana en la luz 34. El medio de crecimiento líquido se fuerza a presión a través de la membrana 12 utilizando una fuente neumática tal como una fuente de aire comprimido o mecánica tal como una bomba o una combinación de aire comprimido y una bomba. A medida que la nueva biomasa se aligera debido al crecimiento del cultivo en la solución nutriente, la biopelícula aumenta en espesor hasta que parte de la biopelícula queda privada de nutrientes y se establece el gradiente de nutriente descrito anteriormente en la presente memoria. El procedimiento permite la producción de metabolitos secundarios durante un periodo ampliado. Este periodo finaliza cuando la lisis de las células muertas libera contaminantes o cuando la resistencia de la biopelícula es demasiado elevada para permitir la penetración de la membrana 12 por el medio de crecimiento.

Con referencia a la Figura 4A de los dibujos, se muestra un régimen de flujo de fluido típico en el que una fuente neumática 40 tal como aire comprimido se utiliza para presurizar la solución nutriente contenida en un depósito 42 para alimentar la solución nutriente a presión al espacio extracapilar 44 definido entre el alojamiento del biorreactor 10 y la membrana 12. Tras atravesar la membrana 12, la solución nutriente que contiene el producto se recoge en un recipiente 46 de recogida del producto.

Con referencia a la Figura 4B, se utiliza una fuente mecánica 48 para bombear la solución nutriente al espacio extracapilar 44. Tras pasar a través del biorreactor, el producto se separa de la solución nutriente que contenía el producto, que se devolvió al depósito 42. El producto separado se recogió en el recipiente 46 de recogida del producto.

Con referencia a la Figura 4C, se utilizaron una fuente neumática 40 y una fuente mecánica 48 en combinación para alimentar la solución nutriente al biorreactor y para extraer de la anterior la solución nutriente que contenía el producto. La fuente neumática 40 se sitúa corriente arriba del biorreactor para alimentar la solución nutriente en el espacio extracapilar 44 y la fuente mecánica se localiza corriente abajo del biorreactor y funciona como una bomba de succión o vacío para extraer la solución nutriente que contiene el producto desde la luz 34, que se recoge en el recipiente 46 de recogida del producto.

El régimen de flujo de fluido que se muestra en la Figura 4D es similar al régimen de flujo de fluido representado gráficamente en la Figura 4C, siendo la única diferencia que no se utiliza la fuente neumática.

5 Se apreciará que la configuración exacta del biorreactor y del régimen de flujo de fluido puede variar mucho aun incorporando a la vez las características esenciales definidas anteriormente en la presente memoria

10 El biorreactor de acuerdo con la memoria, permite una elevada transferencia de masa de los nutrientes a las células de los microorganismos debido al flujo convectivo de la solución nutriente líquida a través de la membrana. Este flujo proporciona también una rápida eliminación del producto secretado procedente del biorreactor evitando a la vez cualquier flujo inverso de producto secretado posteriormente a través de la membrana. Debido al hecho de que el producto se elimina pronto después de la producción, existe una pérdida mínima de producto debido a la descomposición. El biorreactor no requiere agitación mecánica que pueda dañar las células de los microorganismos. Como resultado, el cultivo del microorganismo en el biorreactor 10 es más productivo y se reduce la descomposición del producto. También, no se produce espumado, obviándose la necesidad de agentes antiespumantes y permitiendo el uso de una mayor proporción de la capacidad del reactor. A medida que se retiene la biomasa en el reactor, se reducen las operaciones unitarias debido a que no se requiere cosecha y el producto es de una pureza relativamente elevada. El biorreactor permite una densidad celular relativamente elevada por unidad de volumen dando como resultado una mayor productividad volumétrica de los productos intracelulares y extracelulares. Cuando funciona, el biorreactor permite ampliar la producción de los metabolitos secundarios secretados o una biomasa de elevado rendimiento asociada con los metabolitos intracelulares.

25 La concentración de los productos residuales metabólicos aumenta a medida que la solución nutriente perfunde la biopelícula, que puede también regular la formación de producto en los cultivos en los que la acumulación del residuo metabólico induce la producción de metabolitos secundarios.

25 Ejemplo 1

***Bacillus subtilis* ATCC 21332 – Producción de surfactina en condiciones de oxígeno limitado**

30 La surfactina es un biotensioactivo similar a un lipopéptido producido por diversas cepas de *B. subtilis*. Los biotensioactivos tienen habitualmente las ventajas de la biodegradabilidad, reducida toxicidad y biocompatibilidad sobre los tensioactivos sintetizados químicamente y retienen su función a extremos de temperatura, pH y salinidad (Georgiou y col, 1992). La surfactina presenta también propiedades antimicrobianas (Vollenbroich y col 1997a), antiviricas (Vollenbroich y col 1997b), de inhibición de la coagulación de la fibrina (Bernheimer y col 1970) y antiinflamatorias.

35 *B. subtilis* se describe comúnmente como un aerobio estricto pero se ha informado también que es posible el crecimiento anaerobio (Nakano y col 1999; Davis y col 1999). Además, los niveles de producción de la surfactina han demostrado potenciarse en condiciones de crecimiento limitantes del oxígeno (Davis y col 1999). Se han desarrollado también una mejora del biorreactor y un diseño del proceso para la producción de surfactina, principalmente a través de la optimización del medio (Cooper y col 1981; Wei y Chu 1998; Davis y col 1999; Wei y col 2003; Wei y col 2004), un cultivo de elevada densidad celular y la concentración y extracción de surfactina en la espuma procedente de fermentadores (Davis y col 2001; Yeh y col 2006).

45 La adición de nitrato de amonio al medio de crecimiento mejoró el rendimiento de la biomasa en condiciones limitantes de oxígeno y demostró potenciar la producción de surfactina (Davis y col 1999). Una mejora en la capacidad de tamponamiento del medio de crecimiento (Wei y col 2003), MgSO₄ y FeSO₄ (Cooper y col 1981; Wei y col 2004) demostraron también mejorar los rendimientos de la surfactina (Wei y Chu 1998; Wei y col 2003).

50 Esterilización

Los biorreactores se autoclavaron y se configuraron para funcionamiento anaerobio de acuerdo con procedimientos de funcionamiento normalizados (PFN). Se dispensó asépticamente medio esterilizado con filtro en cada uno de los recipientes de suministro del medio antes de comenzar el experimento.

55

Inoculación

60 Cada uno de los biorreactores se inoculó con 3 ml de *B. subtilis* del preinóculo de la ATCC, cultivado en caldo nutriente (Merck) a 30° C durante 24 h. Se inyectó el inóculo asépticamente de forma directa en el espacio extracápsular (EEC) de cada biorreactor, es decir, el espacio entre la superficie externa de la membrana capilar y en el interior del manguito de vidrio, de acuerdo con los PFN.

Funcionamiento

65 Los biorreactores se colocaron en bancos en los que se reguló el suministro de medio utilizando una única fuente de

aire comprimido. Se suministró a cada biorreactor de 20 ml de un banco dado nutriente procedente de su propio recipiente de suministro de medio. Dentro de cada banco, se suministró a cada réplica de biorreactor tanto medio con sales minerales (Cooper y col. 1991) como con sales minerales enriquecidas con hierro (Wei y col. 2003).

- 5 Tras la inoculación, se suministró medio a cada biorreactor a 5 kPa. Se ajustaron las presiones a intervalos con el fin de mantener el pH del permeato por encima de pH 6.

Análisis

- 10 Los biorreactores se muestrearon periódicamente y se registraron el pH y los volúmenes. Se ajustó el pH de las muestras a ~ pH 2 utilizando HCl concentrado con el fin de precipitar y concentrar la surfactina antes de centrifugar a 4000 rpm durante 10 min a 4°C. Se decantó el sobrenadante y se volvió a suspender el residuo en 1:20 vol. de etanol absoluto. El concentrado se transfirió a un tubo de microfuga y se centrifugó a 14 000 rpm utilizando una microfuga antes del análisis.

- 15 Se midió la concentración de la surfactina mediante HPLC en fase inversa (waters: modulo de separaciones 2695, PDA 2696) equipada con una columna Xterra C18 (5 µm, 3,9 mm x 150 mm). La fase móvil consistió en un 30 % de ácido trifluoroacético 3,8 mM y un 70 % de acetonitrilo. Todos los solventes fueron de calidad HPLC. El tamaño de la muestra fue de 50 µl y la velocidad de elución fue de 1 ml/min. Se vigilo la absorbancia del eluyente a 205 nm. Se calculó la surfactina a partir de Fluka (Nº de Cat. 86196). El cálculo se basó en los 8 picos principales identificados en el patrón (véase la Figura 5A).

Productividad

- 25 El crecimiento de *B. subtilis* y la producción de surfactina en biorreactores que utilizaban el medio de crecimiento publicado para la producción óptima de surfactina se obstaculizó mediante la precipitación del medio de crecimiento en el tiempo. La precipitación de los componentes del medio fue más pronunciada en el medio de crecimiento que contenía niveles crecientes de FeSO₄ (Wei y col. 2006). La precipitación dio como resultado una reducción del pH de la solución nutriente, la inhibición del crecimiento del microorganismo y la formación de surfactina insoluble (precipita en soluciones por debajo de pH 6).

- 35 Con referencia a la Figura 5B, que muestra un cromatograma típico de HPLC de la surfactina producida por *B. subtilis* de la ATCC 21332 cultivada en un biorreactor de 20 ml. Aunque se identificaron los ocho picos principales en la muestra, la relación de estos picos difirió de la observada en el patrón (Figura 5A). Además de los ocho picos identificados en el patrón de Fluka, se observaron dos picos principales adicionales en las muestras que no estaban presentes en el patrón (Figura 5B). Estos picos no se han identificado.

- 40 La producción de surfactina en el medio de crecimiento enriquecido con hierro fue despreciable. Se observó un aumento de la precipitación de nutrientes con el tiempo en este medio dando como resultado una reducción en el pH de la solución nutriente a por debajo de pH 5, con inhibición del crecimiento del microorganismo y precipitación de cualquier surfactina que se haya producido por el microorganismo. Al cambiar el medio de crecimiento a un medio de la sal mineral de Cooper se recuperaron tanto el pH como el crecimiento y mejoró la producción de surfactina (no se muestran los datos).

- 45 La Tabla 2 relaciona la productividad de los biorreactores cultivados utilizando el medio de sales minerales de Cooper. Mayores niveles de surfactina se correlacionaron con un aumento del caudal y mayores niveles del pH. La surfactina precipita en soluciones por debajo de pH 6. Además, se requiere la optimización del medio para maximizar el crecimiento anaerobio de *B. subtilis*, optimizar la producción de surfactina y evitar la precipitación del medio.

- 50 **Tabla 2: Producción de surfactina en biorreactores cultivados utilizando el medio de sales minerales de Cooper (n=2)**

Tiempo (h)	20	35	42	48	59	65
kPa	5	5	10	10	10	10
pH	6,7	6,7	6,3	6,0	6,0	6,0
Vol. del permeato (ml)	133	159	22	26	36	19
Flujo	19	11	3	4	3	3
Cono de surfactina (µg/ml)	18,480	14,500	5,000	0,260	0,080	0,300
Surfactina total (mg)	2,4551	2,2813	0,1100	0,0066	0,0014	0,0057

Productos recombinantes:

Con referencia a las Figuras 1 a 4 de los dibujos, un aparato para producir una proteína recombinante en condiciones limitantes de oxígeno o de cultivo anaerobio, de acuerdo con la memoria, se designó de forma general mediante el número de referencia 10. El aparato está en la forma de un biorreactor 10 que se muestra en la Figura 1 de los dibujos a una escala de laboratorio, sin embargo, se apreciará que los principios plasmados en el biorreactor se pueden aplicar a una escala ampliada o de realización comercial.

El biorreactor 10 incluye una membrana capilar de fibra hueca cerámica 12 que se introduce en los extremos de la membrana en inserciones plásticas 14, 16 con epoxi 18, que comprende una inserción cerámica. Debe apreciarse que se pueden utilizar también resinas alternativas o tecnología de cierre hermético mecánico. Un alojamiento o carcasa del reactor 20 de vidrio se dispone coaxialmente con la membrana capilar 12 y va provisto de tapones 22 y 23 en los extremos roscados sobre el alojamiento 20 de vidrio. El alojamiento 20 incluye una entrada de alimentación 26 para introducir una solución de alimentación del nutriente líquido para microorganismos dentro del espacio 24 entre el sustrato poroso y el alojamiento y la entrada de la inoculación 25 para introducir un inóculo en el alojamiento para unión a la membrana 12. El alojamiento incluye además una salida de la alimentación 27 para descargar la solución de alimentación desde el alojamiento. La inserción cerámica 12, 14, 16 incluye una salida del producto 28 en comunicación de fluido con la luz del capilar 34 para descargar el permeato procedente del alojamiento.

En uso, se establece una biopelícula 32 sobre una superficie externa 30 de la membrana capilar 12. Esto se consigue filtrando una spora o inóculo vegetativo del microorganismo deseado a través de la membrana capilar 12 y drenando cualquier permeato que salga de la luz 34 y a través de la salida 28. La luz 34 está de esta manera en comunicación de fluido con la salida 28. El inóculo se inmoviliza de esta manera sobre la superficie de la membrana 30. La membrana 12 tiene una piel 36 porosa, relativamente delgada en el interior y una estructura 38 con huecos, externamente sin piel, gruesa, en forma de dedo que radia hacia el exterior de la piel 36. Normalmente, la membrana 12 tiene, pero no está limitada a un diámetro externo de aproximadamente 3 mm.

La solución nutriente adecuada para el microorganismo se introdujo en el alojamiento mediante la entrada de nutriente 26. Se hizo que la solución nutriente fluyera a través de la membrana 12 en una dirección desde el lado externo de la membrana al lado interno de la misma. Para la producción de los metabolitos secundarios es fundamental el concepto de privación de nutriente, que estresa al microorganismo, y controla de esta manera la producción de metabolitos secundarios. Esto se consigue en el biorreactor 10 de biopelícula inmovilizada por membrana mediante la producción de gradientes radiales de concentración de nutrientes a través de la biopelícula 32. Como resultado, la concentración de nutriente en la superficie externa expuesta de la biopelícula 32 es elevada, mientras que la concentración de nutriente en la interfase 30 membrana / biopelícula es baja. En las Figuras 2 y 3 de los dibujos, para fines de ilustración, se designa una zona de elevada concentración del nutriente mediante el número de referencia I y se designa una zona de baja concentración del nutriente mediante el número de referencia II. En la zona I la concentración del nutriente es lo suficientemente elevada para sostener el crecimiento primario de los microorganismos, mientras que en la zona II la concentración del nutriente es lo suficientemente baja para producir la privación de nutriente, que estresa a los microorganismos, y por tanto para inducir y sostener una fase estacionaria de los microorganismos, y el nivel de la molécula inductora es suficientemente elevado para inducir la producción de proteína recombinante. Se establece una población de células en crecimiento y reproducción en la biopelícula en la superficie externa expuesta de la membrana, mientras que se producen proteínas recombinantes durante periodos ampliados en la zona II de la biopelícula. En la Figura 3, un gráfico "A" representa gráficamente el nivel de concentración del nutriente (eje y) frente a la distancia desde la superficie de la membrana (eje x).

La porosidad de la membrana 12 es tal que permite el paso de los metabolitos secundarios a través de la membrana a la luz 34, mientras que se evita que las células de los microorganismos pasen a través de la membrana. Como resultado, las proteínas recombinantes producidas en la zona II de la biopelícula se transportan hacia el interior en la luz 34 de la membrana por el flujo de la solución nutriente desde el lado externo de la membrana en la luz 34 o el segundo lado de la membrana. El medio de crecimiento líquido se fuerza neumáticamente a presión a través de la membrana 12 utilizando aire comprimido (u otro gas adecuado) o mecánicamente utilizando una bomba o una combinación de aire comprimido y una bomba. A medida que la nueva biomasa se aligera debido al crecimiento del cultivo en la solución nutriente, la biopelícula aumenta en espesor hasta que parte de la biopelícula queda privada de nutrientes y se establece el gradiente de nutriente descrito anteriormente en la presente memoria. El procedimiento permite la producción de proteínas recombinantes durante un periodo ampliado. Este periodo finaliza cuando la lisis de las células muertas libera los contaminantes o cuando la resistencia de la biopelícula es demasiado elevada para permitir la penetración de la membrana 12 por el medio de crecimiento.

Con referencia a la Figura 4A de los dibujos, se muestra un régimen de flujo de fluido típico en el que una fuente neumática 40 tal como aire comprimido se utiliza para presurizar la solución nutriente contenida en un depósito 42 para alimentar la solución nutriente a presión en el espacio extracapilar 44 definido entre el alojamiento del biorreactor 10 y la membrana 12. Tras pasar a través de la membrana 12, el permeato se recoge en un recipiente 46 de recogida del producto.

Con referencia a la Figura 4B, se utiliza una fuente mecánica tal como una bomba 48 para presurizar la solución nutriente al espacio extracapilar 44. Tras pasar a través del biorreactor, el producto se separa de la solución nutriente que contenía el producto, que se devolvió al depósito 42. El producto separado se recogió en el recipiente 46 de recogida del producto.

5 Con referencia a la Figura 4C, se utilizaron una fuente neumática 40 tal como aire comprimido y una fuente mecánica 48 tal como una bomba en combinación para alimentar la solución nutriente al biorreactor y para extraer de la anterior la solución nutriente que contenía el producto. La fuente neumática 40 se sitúa corriente arriba del biorreactor para la alimentación de la solución nutriente en el espacio extracapilar 44 y la bomba se localiza corriente abajo del biorreactor y funciona como una bomba de succión o vacío para extraer el permeato desde la luz 34, que se recoge en el recipiente 46 de recogida del producto.

10 El régimen de flujo de fluido que se muestra en la Figura 4D es similar al régimen de flujo de fluido representado gráficamente en la Figura 4C, siendo la única diferencia que no se utiliza la fuente de gas presurizado.

15 Se apreciará que la configuración exacta del biorreactor y del régimen de flujo de fluido puede variar mucho aun incorporando a la vez las características esenciales definidas anteriormente en la presente memoria

20 El biorreactor de acuerdo con la memoria, permite una elevada transferencia de masa de los nutrientes a las células de los microorganismos debido al flujo convectivo de la solución nutriente líquida a través de la biopelícula y el sustrato. Este flujo proporciona también una rápida eliminación del producto procedente del biorreactor evitando a la vez cualquier flujo inverso de producto secretado posteriormente a través de la membrana. Debido al hecho de que el producto se elimina pronto después de la producción, existe una mínima pérdida de producto debido a la descomposición. El biorreactor no requiere agitación mecánica que pueda dañar las células de los microorganismos.

25 Como resultado, el cultivo del microorganismo en el biorreactor 10 es más productivo y se reduce la descomposición del producto. También, no se produce espumado, obviándose la necesidad de agentes antiespumantes y permitiendo el uso de una mayor proporción de la capacidad del reactor. A medida que se retiene la biomasa en el reactor, se reducen las operaciones unitarias debido a que no se requiere cosecha y el producto es de una pureza relativamente elevada. El biorreactor permite una densidad celular relativamente elevada por unidad de volumen dando como resultado una mayor productividad volumétrica. Cuando funciona, el biorreactor permite ampliar la producción de proteínas recombinantes.

30 La concentración de los productos residuales metabólicos aumenta a medida que la solución nutriente perfunde la biopelícula, que puede también inducir la formación de producto en los cultivos en los que la acumulación del residuo metabólico regula la expresión génica. Se apreciará que tras el establecimiento del gradiente de nutriente la formación de producto puede inducirse por un pH bajo y la acumulación de ácidos orgánicos.

Ejemplo 2

40 Sistema de expresión de *Lactococcus lactis* P170 (Bioneer AIS, Copenhague, Dinamarca)

El sistema de expresión de *L. lactis* P170 es un sistema de expresión autoinducible que se induce en condiciones de crecimiento limitantes de glucosa y con la acumulación de ácido láctico, producido por el organismo, en el ambiente de crecimiento. El pH óptimo para la inducción está entre pH 5.5 - 6.5. El producto se secreta.

45 Se utilizó en este ejemplo la cepa PRA290 de *L. lactis*, diseñada mediante ingeniería genética para producir β -lactamasa bajo el control de P170. Se cuantificó la actividad de la β -lactamasa en el permeato espectrofotométricamente utilizando un procedimiento de una placa de microvaloración de 96 pocillos basado en el procedimiento de la nitrocefina (Oxoid).

50 Esterilización

Los biorreactores 10 se autoclavaron y se configuraron para funcionamiento anaerobio de acuerdo con procedimientos de funcionamiento normalizados (PFN). Se dispensó asépticamente medio esterilizado con filtro en cada uno de los recipientes de suministro de medio antes de comenzar el experimento.

Inoculación

60 Cada uno de los biorreactores 10 se inoculó con 1 ml de *L. lactis* PRA290 (productor de β -lactamasa) antes del inóculo, cultivado en medio de crecimiento M17-G5 (Oxoid) a 30°C durante 16 h. El inóculo se inyectó directamente en el espacio extracapilar (EEC) de cada biorreactor, es decir, el espacio entre la superficie externa de la membrana capilar y el interior del manguito de vidrio, de acuerdo con los PFN.

Funcionamiento

Los biorreactores se colocaron en bancos en los que se reguló el suministro de medio utilizando una única fuente de aire comprimido. Se suministró a cada biorreactor de un banco dado nutriente procedente de su propio recipiente de suministro de medio. Dentro de cada banco, se suministró a cada réplica de biorreactor LM5-V100-G75 (Tabla 1) que contenía tampón fosfato de potasio tanto 200 mM como 400 mM (pH 7,2). Se evaluaron el flujo, el pH y la actividad de la β -lactamasa sobre muestras recientes.

Tras la inoculación, se suministró medio a cada SFR a 8 kPa durante la noche. Se ajustaron las presiones como sigue:

Tabla 3

Tiempo después de la inoculación (h)	Presión (kPa)
0	8
16	13
22	18
28	30
30	50
34	70
36	80

Productividad

Con referencia a las Figuras 6A y 6B de los dibujos, se muestran gráficos que ilustran el uso del biorreactor en la producción de la enzima recombinante β -lactamasa. Se realizó un seguimiento de la producción de β -lactamasa en biorreactores que funcionaban con medio de crecimiento que contenía tampón 200 mM (Figura 6A) o 400 mM (Figura 6B).

Con respecto a la Figura 6, se puede observar que hubo una demora inicial en la producción de β -lactamasa en las primeras 14-22 horas de funcionamiento. Esto fue debido a la acumulación inicial de biomasa hasta que se obtuvo una biopelícula suficientemente gruesa para permitir el establecimiento de gradientes de nutrientes a través de la biopelícula, así como niveles suficientemente elevados de ácido láctico producidos adicionalmente para inducir la formación de β -lactamasa. La acumulación de biomasa fue más rápida en el medio de crecimiento tamponado con un tampón de molaridad más baja, esto se reflejó en un inicio más temprano de la actividad de la β -lactamasa cuando se utilizó medio tamponado con tampón 200 mM (Figura 6A). El marcado aumento en la producción de β -lactamasa observado cuando se utilizaba medio tamponado con tampón 400 mM (Figura 6B) resalta el mecanismo de inducción regulado mediante el pH del sistema de expresión P170. Se puede observar que se amplía la producción más allá de 30 horas.

En la Tabla 5 se relacionan los niveles de productividad registrados para los biorreactores que funcionaban utilizando medio de crecimiento tamponado con tampón 200 mM o 400 mM. En promedio, se observaron concentraciones máximas mayores cuando se cultivaron utilizando medio tamponado con tampón 400 mM (Tabla 5) con un máximo de 24 685 unidades/l registrado. Las productividades volumétricas no difieren significativamente entre medios de crecimiento diferentes sino que estaban más bien correlacionadas con un aumento del flujo. Un flujo mayor puede mantener el pH comprendido dentro del intervalo de producción (pH 5,5 – 6,5) y mejorar la solubilidad del producto, particularmente en un medio de crecimiento con una mayor concentración de sal.

La secreción del producto en el permeato limita la contaminación por las proteínas intracelulares, niega la necesidad de la eliminación de biomasa por centrifugación y facilita procesos de purificación corriente abajo más sencillos.

Tabla 4: Composición del medio de crecimiento de *L. Lactis*

Componente	LMS-V100-G7S
FeSO ₄	50 μ M
CaCl ₂	25 μ M
MgCl ₂	2,6 mM
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	15 nM
H ₃ BO ₃	2,0 μ M
CoCl ₂	150 nM
CuSO ₄	50 nM
MnCl ₂	400 nM
ZnSO ₄	50 nM
K ₂ SO ₄	1,38 mM

Componente	LMS-V100-G7S
KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄	200 mM/400 mM
Biotina	0,5 mg/l
Ácido fólico	5 mg/l
Riboflavina	5 mg/l
Niacinamida	5 mg/l
Tiamina•HCl	5 mg/l
Ca-Pantotenato	5 mg/l
Piridoxal•HCl	10 mg/l
Glucosa	75 g/l
Acetato de sodio	14,7 mM
Extracto de levadura	15 g/l
Ácido cítrico	0,5 mM
L-Arginina	1,0 g/l
L-Glutamina	0,5 g/l
L-Serina	1,5 g/l

5 **Tabla 5: actividad de la β -lactamasa y productividad volumétrica registrada para los biorreactores que funcionan utilizando medio de crecimiento tamponado con fosfato 200 mM o 400 mM (pH 7,2). Se calcularon los promedios para cada biorreactor durante un periodo de 33 horas desde T=20 h a T=53 h después de la inoculación.**

	Tampón mM	Actividad de la β -lactamasa (U/l)			Productividad volumétrica (U/h por l. de vol. de reactor)		
		Máx	Promedio	DE	Máx	Promedio	DE
SFR 1	200	15629	10738	3746	9150	5121	1994
SFR 11	200	11918	7306	2630	6054	2842	1613
SFR3	200	18472	10561	4305	9418	4369	1970
SFR4	200	10914	7574	2443	11604	5999	3087
SFR 5	200	16434	9198	3698	13518	6694	3568
SFR6	200	17382	10814	4798	9260	4176	2126
SFR 9	200	14963	8592	3649	11283	4887	3417
SFR10	400	24685	8424	8119	12006	3287	3881
SFR12	400	23308	11010	6541	7056	3819	2479
SFR 7	400	16602	10005	3748	9442	5307	2184
SFR8	400	21682	11672	6335	18183	5910	5576

Ejemplo 3

10 Sistema de expresión pBAD/gIII de *Escherichia coli* (Invitrogen)

15 El plásmido pBAD/g111 es un vector de expresión derivado de pBR3222 diseñado para la expresión regulada de la proteína recombinante secretada y la purificación en *E. coli*. Se utilizó la secuencia señal del gen III para secretar la proteína recombinante en el espacio periplásmico. El promotor *araBAD* regula la expresión, inducida por L-arabinosa. La concentración del inductor controla el nivel de expresión. Esto se puede optimizar para la producción de proteína soluble. El promotor *araBAD* está reprimido en ausencia de L-arabinosa y en presencia de glucosa.

Condiciones de la cepa y el cultivo

20 Células TOP 10 competentes de *E. coli* se transformaron con el plásmido control pBAD/gIII/Calmodulina (productor de calmodulina) tal como se ha descrito para el kit de expresión de pBAD/gIII de Invitrogen (Nº de Cat. V450-01). Se preparó el inóculo a partir de una única colonia inoculando 20 ml de caldo terrífico con 100 µg/ml de ampicilina (Tabla 3) y se incubó durante 16 horas a 37° C, 200 rpm. El pH óptimo para la inducción está entre pH 4-8.

25 Configuración del biorreactor

30 Los biorreactores se colocaron en bancos en los que se reguló el suministro de medio utilizando una única fuente de aire comprimido. Se suministró a cada biorreactor de un banco dado nutriente procedente de su propio recipiente de suministro de medio. El medio de crecimiento utilizado para la producción de calmodulina fue caldo terrífico con 100 µg/ml de ampicilina. Se enriqueció también el medio con NaNO₃ 0,0625 M para estimular el crecimiento anaerobio. Se utilizaron cuatro bancos de tres biorreactores para examinar cuatro niveles diferentes del inductor.

Se enriquecieron los diferentes bancos como sigue:

- BANCO 1: NaNO₃ 0,0625 M
- BANCO 2: NaNO₃ 0,0625 M + L-arabinosa a 0,00002 %
- 5 BANCO 3: NaNO₃ 0,0625 M + L-arabinosa a 0,002 %
- BANCO 4: NaNO₃ 0,0625 M + L-arabinosa a 2 %

Inoculación y funcionamiento

10 Los biorreactores se autoclavaron y se configuraron para funcionamiento anaerobio de acuerdo con los PFN. Se dispensó medio de crecimiento estéril en cada uno de los recipientes de suministro de medio antes del comienzo del experimento.

15 Cada uno de los biorreactores se inoculó con 1 ml de cultivo nocturno de pBAD/gIII/Calmodulina de *E. coli*. El inóculo se inyectó directamente directamente en el ECS de cada biorreactor es decir, el espacio entre la superficie externa de la membrana capilar y el interior del manguito de vidrio, de acuerdo con los PFN.

20 Tras la inoculación, se suministró medio a cada biorreactor a 5 kPa. Se aumentaron las presiones de forma creciente con el fin de inmovilizar la biomasa, limitar el crecimiento platónico y evitar el crecimiento posterior en los recipientes de suministro de nutriente. Se ajustaron las presiones como sigue:

Tabla 6

Tiempo después de la inoculación (h)	Presión (kPa)
0	5
4	10
5	15
7	30
8	80
20	100

Análisis

25 24 horas después de la inoculación, se eliminaron las inserciones de la membrana capilar de cada módulo de biorreactor y se colocaron en un tubo de centrifuga limpio de 50 ml. Utilizando cultivos replicados, se extrajo la calmodulina de las biopelículas usando los procedimientos descritos en el manual de instrucciones de pBAD/gIII de Invitrogen:

30 1) Procedimiento de choque osmótico: se trató cada biopelícula con 10 ml de solución 1 de choque osmótico enfriada en hielo durante 10 minutos, se centrifugó a 4000 rpm durante 10 min y se descartó el sobrenadante. El residuo se trató dos veces con solución 2 de choque osmótico enfriada en hielo durante 10 min, se centrifugó a 4000 rpm durante 10 min. Los sobrenadantes se combinaron y se almacenaron a -20°C.

35 2) Procedimiento de lisis celular: cada biopelícula se volvió a suspender en 10 ml de tampón de lisis celular con 2 ciclos de congelación/descongelación. Las muestras se microfugaron a 14 000 rpm durante 2 min, el sobrenadante se eliminó y almacenó a -20°C.

40 3) Análisis directo: Se volvieron a suspender cada una de las biopelículas en 2 ml de tampón de carga desnaturizado mediante SDS-PAGE y se almacenaron a -20°C.

Se realizó un seguimiento de la producción de calmodulina mediante SDS-PAGE.

45 Crecimiento y productividad

50 Con respecto a la Tabla 7, el rendimiento de la biomasa por biorreactor de 20 ml fue similar en todas las condiciones de crecimiento. Se obtuvo una densidad celular máxima de 7,9 g de peso celular seco por litro de volumen de reactor después de 24 horas. Se extrajo la proteína soluble de las biopelículas utilizando el procedimiento de choque osmótico que mostró una inducción limitada de la producción de calmodulina con L-arabinosa a 0,00002 % en comparación con el control sin inducir. A 0,002 % la L-arabinosa mostró un incremento de 1,2 veces en la síntesis de proteína mientras que la inducción con L-arabinosa a 2 % mostró un incremento de 2,8 veces en la proteína producida por mg de peso celular seco.

Tabla 7: peso celular seco de células y proteína soluble total extraída de la biopelícula utilizando el procedimiento del choque osmótico, como se produjo por biorreactor de 20 ml cultivado con diferentes niveles del inductor L-arabinosa

	Control	L-arabinosa a 0,00002 %	L-arabinosa a 0,002 %	L-arabinosa a 2 %
Peso celular seco en mg	141	134	158	136
Peso celular seco por l. de vol. de reactor	7,1 g	6,7 g	7,9 g	6,8 g
µg/ml de proteína	2,1	2,1	3,0	5,8
µg de proteína	42,9	42,3	59,0	116,7
µg de proteína/mg de peso celular seco	0,304	0,316	0,374	0,858

- 5 La Figura 7 muestra la producción de proteína recombinante por los biorreactores que utilizan pBAD/gIII/Caimodulina de *E. coli* extraída usando el procedimiento de choque osmótico (Figura 7A) o mediante lisis celular y análisis directos (Figura 7B). No se detectó inducción en los biorreactores control (sin inductor) ni en los biorreactores tratados con L-arabinosa a 0,00002 %. Se extrajo la calmodulina soluble utilizando el procedimiento de
- 10 choque osmótico que mostró una mejora de la productividad con un aumento en el nivel de la L-arabinosa (Figura 7A). El extracto del choque osmótico mostró un mayor nivel de pureza en comparación a las preparaciones de proteína procedentes de la lisis celular o de extractos de células completas preparados a partir de cultivos por replicado (Figura 7B).
- 15 Los gradientes de nutriente establecidos a través de la biopelícula en desarrollo permitieron la desrepresión del promotor *araBAD*, a la vez que los niveles crecientes de la molécula de L-arabinosa inductora suministrada en el medio de crecimiento facilitaron la inducción de la expresión. Se extrajeron niveles superiores de proteína soluble procedente de las células mediante la lisis celular, sin embargo, se consiguió un producto más puro mediante el choque osmótico. Este procedimiento puede optimizarse y llevarse a cabo de forma adicional *in situ*, extrayendo
- 20 proteínas en el permeato a la vez que se retienen las células, negando la necesidad de etapas de centrifugación e integradas con soluciones de procesamiento corriente abajo más sencillas.

Referencias

1. Heinemann, B., Howard, A.J. y Palocz H.J. (1970) Influence of dissolved oxygen levels on production of L-asparaginase and prodigiosin by *Serratia marcescens*. Appl. Microbiol. 19, pp. 800-804.
- 5 2. Davis, D.A, Lynch, H.C. y Varley, J. (1999) The production of Surfactin in batch culture by *Bacillus subtilis* ATCC 21332 is strongly influenced by the conditions of nitrogen metabolism. Enzyme and Microbial Technology 25, pp. 322-329.
- 10 3. Georgiou, G., Lin S-C. y Sharma M.M. (1992) Surface active compounds from microorganisms. Biotechnol. 10, pp. 60-64.
4. Vollenbrioch D., Ozel, M., Vater, J., Kamp, R.M. y Pauli, G. (1997a) Mechanism of inactivation of enveloped viruses by surfactin from *Bacillus subtilis*. J. Gen. Microbiol. 25, pp. 289-297.
- 15 5. Vollenbrioch, D., Pauli, G., Ozel, M. y Vater, J. (1997b) Antimycoplasma properties and application in cell culture of surfactin, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis*. Appl. Environ. Microbiol. 63, pp. 44-49.
6. Bernheimer, AW. y Avigad, L.S (1970) Nature and properties of a cytolytic agen produced by *Bacillus subtilis*. J. Gen. Microbial. 61, pp. 361- 369.
- 20 7. Nakano, M.N. y Hulett, F.M. (1999) Adaptation of *Bacillus subtilis* to oxygen limitation. FEMS Microbial. Lett. 157, pp. 1-7.
8. Cooper D.G., MacDonald, C.R., Duff, S.F.B. y Kosaric, N. (1981) Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. Appl. Environ. Microbiol. 42, pp. 408-412.
- 25 9. Wei, Y.H. y Chu I.M. (1998) Enhancement of surfactin production in iron-enriched media by *Bacillus subtilis* ATCC 21332. Enzyme Microbial Technol. 22, pp. 724-728.
- 30 10. Wei, Y.H., Wang L.F., Chang J.S. y Kung S.S. (2003) Identification of induced acidification in iron-enriched cultures of *Bacillus subtilis* during biosurfactant fermentation. J. Bioscience and Bioeng. 96, pp. 174-178.
11. Wei Y.H., Wang L.F. y Chang J.S. (2004) Optimizing iron supplement strategies for enhanced surfactin production with *Bacillis subtilis*. Biotechnol Prog. 20, pp. 979-983.
- 35 12. Davis, D.A, Lynch, H.C. y Varley, J. (2001) The application of foaming for the recovery of surfactin from *B. subtilis* ATCC 21332 cultures. Enzyme Microbial Technol. 28, pp. 346-354.
13. Yeh, M.S., Wei, Y.H. y Chang J.S. (2006) Bioreactor design for enhanced carrier-assisted surfactin production with *Bacillus subtilis*. Process Biochem. 41, 1799-1805. 14. Studier, W.F. (2005). Protein production by auto - induction in high-density shaking cultures. Protein Expression and Purification 41, pp. 207 - 234
- 40 15. de Vos (1999). Gene Expression systems for lactic acid bacteria. Current Opinion in Microbiology 2, pp. 289 - 295. 16. Kuipers, O.P., Pascalle, G.G.A; Kleerebezem, M y de Vos, W. M. (1997). Controlled overproduction of proteins by lactic acid bacteria. TiBTech 15, pp. 135-140.
- 45 17. Xu Xia Zhou, Wei Fen Li, Guo Xia Ma y Yuan Jiang Pan. (2006) The nisin-controlled gene expression system: Construction, application and improvements. Biotech. Advances 24, pp. 285-295.
- 50 18. Madsen, S.M., Arnau, J., Vrang, A, Givskov M. e Israelsen H. (1999) Molecular characterization of the pH-inducible and growth phase- dependent promoter P170 of *Lactococcus lactis*. Mol. Microbiol. 32, pp. 75-87

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de producción de metabolitos secundarios en condiciones de oxígeno limitado o de cultivo anaerobio, cuyo procedimiento incluye:
- 5 proporcionar un sustrato poroso que tenga un primer lado y un segundo lado y que tenga una biopelícula de microorganismos unida al primer lado del mismo, estando configurado el sustrato para permitir el paso de metabolitos secundarios a su través y para evitar el paso de las células de los microorganismos a su través, y hacer que una solución nutriente fluya a través de la biopelícula y el sustrato en una dirección desde el primer lado del mismo al segundo lado del mismo en condiciones de oxígeno limitado o de cultivo anaerobio, a una
- 10 velocidad que sea lo suficientemente baja para que se establezca un gradiente de nutriente a través de la biopelícula en el que la concentración de nutriente sea relativamente elevada respecto de la del sustrato y suficientemente elevada para sostener el crecimiento primario de los microorganismos y en el que la concentración de nutriente sea relativamente baja próxima a la del sustrato, y lo suficientemente baja para inducir y sostener una fase estacionaria de los microorganismos y dar lugar por tanto a que los microorganismos
- 15 produzcan al menos un metabolito secundario, transportando el flujo de la solución nutriente a través del sustrato dicho metabolito secundario a través del sustrato hasta el segundo lado del mismo en el que se puede recoger el metabolito secundario secretado, reteniéndose las células de los microorganismos procedentes de la biopelícula en el primer lado del mismo.
- 20 2. Un procedimiento de la reivindicación 1, en el que los microorganismos se seleccionan entre el grupo que consiste en *Clostridium sp.*, *Bacillus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Vibrio sp.*, *Rhodopseudomonas sp.*, *Desulphovibrio desulfuricans*, y *Candida sp.*
3. Un procedimiento de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el caudal de la solución nutriente desde el
- 25 primer lado al segundo lado es de 0,01 – 10 volúmenes de solución nutriente por volumen de biorreactor por hora.
4. Un procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el procedimiento se lleva a cabo durante un periodo de 1 – 30 días.
- 30 5. Un procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la biopelícula tiene un espesor de 0,1 – 10 mm.
6. Un procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el metabolito secundario se produce intracelularmente por los microorganismos.
- 35 7. Un procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el metabolito secundario se produce extracelularmente por los microorganismos.
8. Un procedimiento de producción de al menos un producto recombinante en condiciones de oxígeno limitado o de
- 40 cultivo anaerobio, cuyo procedimiento incluye:
proporcionar un sustrato poroso que tenga un primer lado y un segundo lado y que tenga una biopelícula de microorganismos unida al primer lado del mismo, estando configurado el sustrato para permitir el paso de producto recombinante a su través y para evitar el paso de las células de los microorganismos a su través, y
- 45 hacer que una solución nutriente fluya a través de la biopelícula y el sustrato en una dirección desde el primer lado del mismo al segundo lado del mismo en condiciones limitantes de oxígeno o de cultivo anaerobio, a una velocidad que sea lo suficientemente baja para que se establezca un gradiente de nutriente que tenga un diferencial de concentración a través de la biopelícula en el que la concentración de nutriente sea relativamente elevada respecto de la del sustrato y lo suficientemente elevada para sostener el crecimiento primario de los
- 50 microorganismos y en el que la concentración de nutriente sea relativamente baja próxima a la del sustrato, y lo suficientemente baja para inducir y sostener una fase estacionaria de microorganismos y dar lugar por tanto a que los microorganismos produzcan al menos un producto recombinante, transportando el flujo de la solución nutriente a través del sustrato dicho producto recombinante a través del sustrato al segundo lado del mismo en el que se puede recoger el producto recombinante, reteniéndose las células de los microorganismos procedentes de la biopelícula en el primer lado del mismo.
- 55 9. Un procedimiento de la reivindicación 8 en el que los microorganismos se seleccionan entre *Lactococcus lactis*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pichia sp.*, *Candida sp.*, *Hansenula polymorpha* y *Sacharomyces cerevisiae*.
10. Un procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 9, en el que el procedimiento se lleva a cabo
- 60 durante un periodo de 1 – 30 días.
11. Un procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en el que el caudal de la solución nutriente desde el primer lado al segundo lado es de 0,001 – 10 volúmenes de solución nutriente por volumen de biorreactor
- 65 por hora.

12. Un procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en el que la biopelícula tiene un espesor de 0,1 – 10 mm.
- 5 13. Un procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, que incluye añadir una molécula inductora a la solución nutriente de tal manera que el flujo de la solución nutriente a través del sustrato transporta dicha molécula inductora a través de la biopelícula desde el primer lado al segundo lado, para inducir, por tanto, la producción de dicho producto recombinante por los microorganismos.
- 10 14. Un procedimiento de la reivindicación 13, en el que el inductor se selecciona entre al menos uno de L-arabinosa, isopropil-b-D-tiogalactósido (IPTG) y metanol.
- 15 15. Un procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 14, en el que el metabolito secundario se produce intracelularmente por los microorganismos.
16. Un procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 14, en el que el metabolito secundario se produce extracelularmente por los microorganismos.

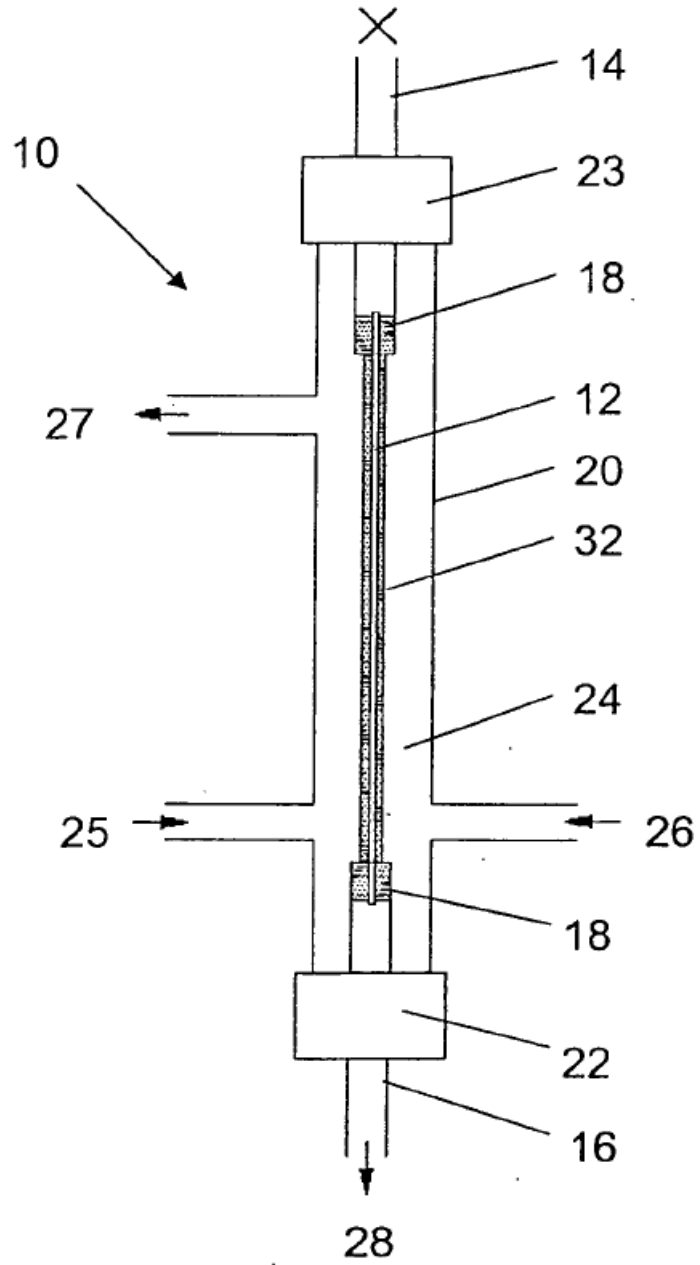


FIG 1

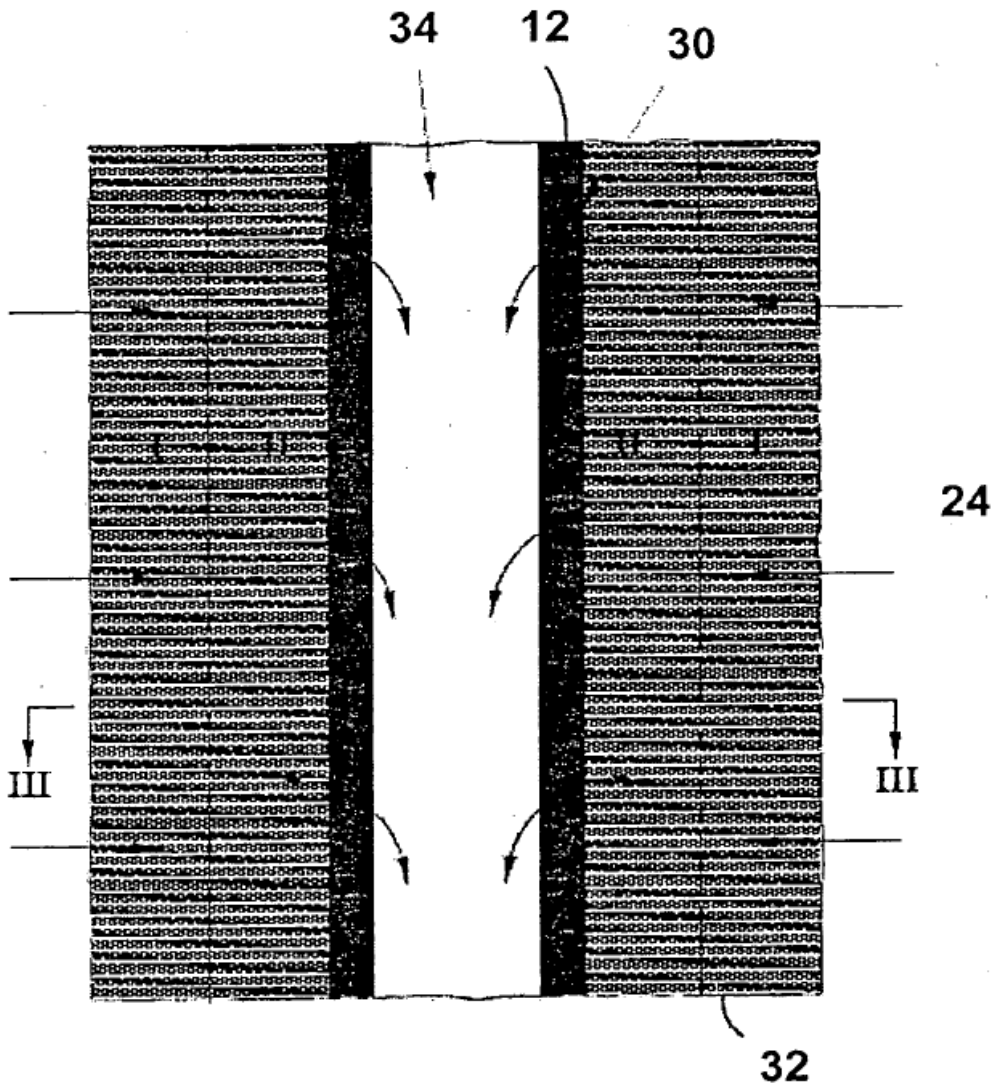


FIG 2

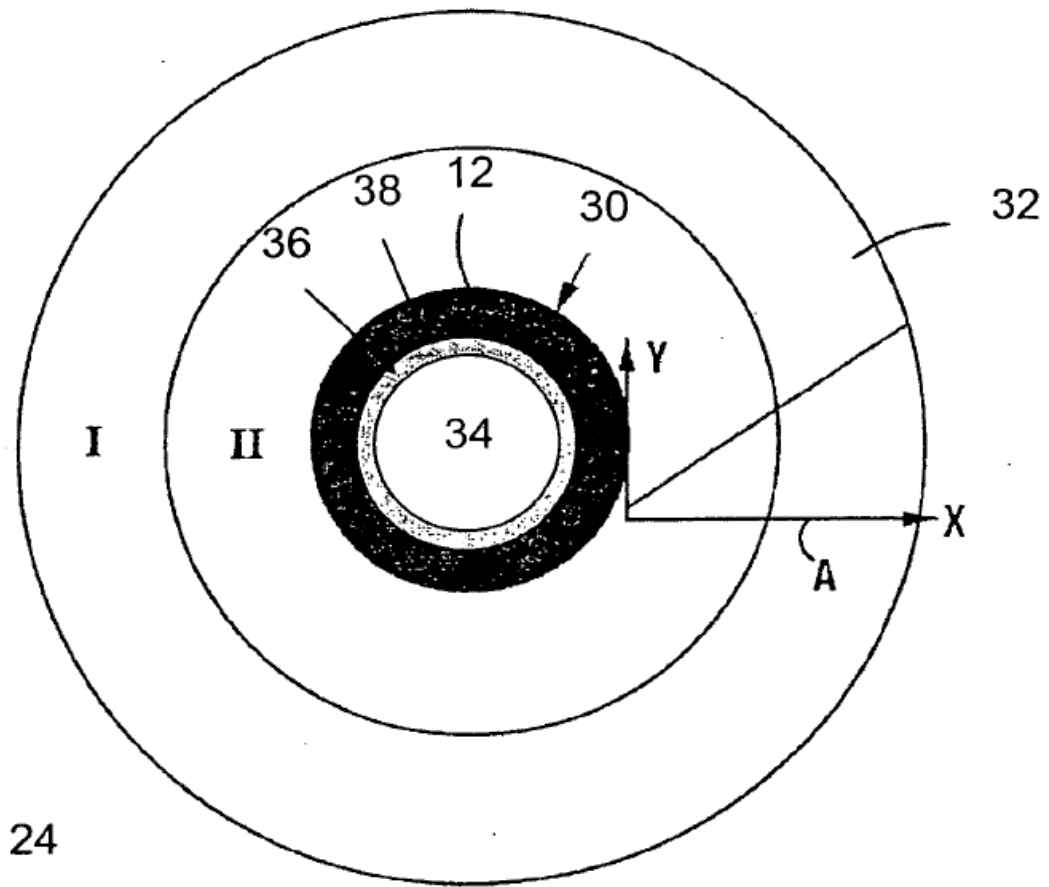


FIG 3

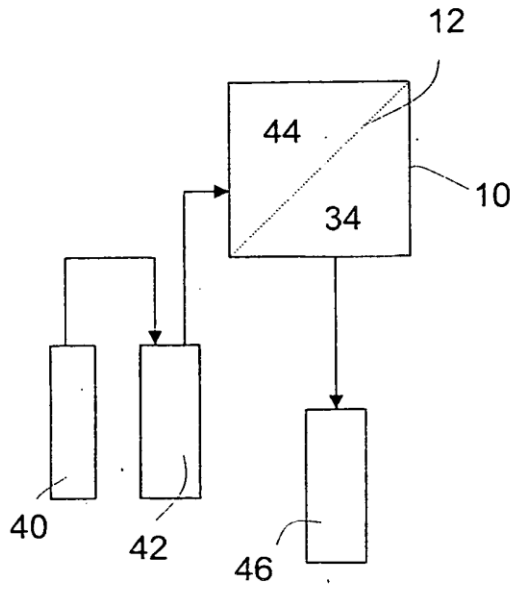


FIG. 4A

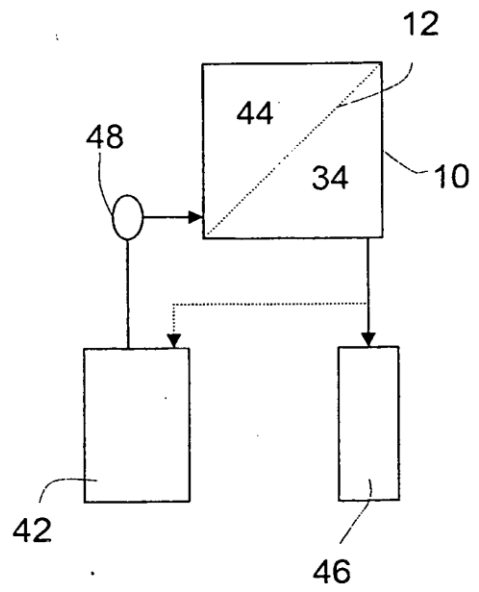


FIG. 4B

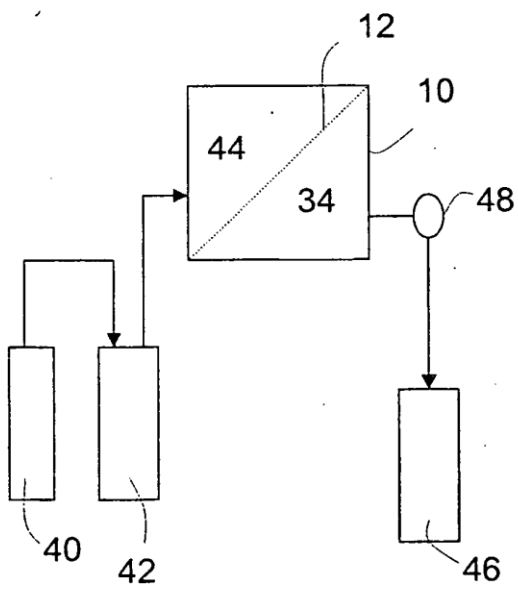


FIG. 4C

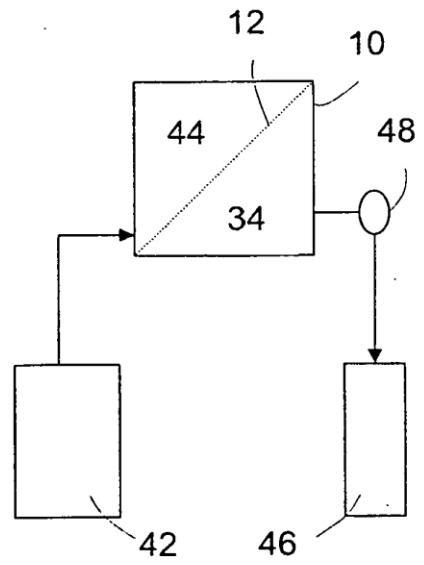


FIG. 4D

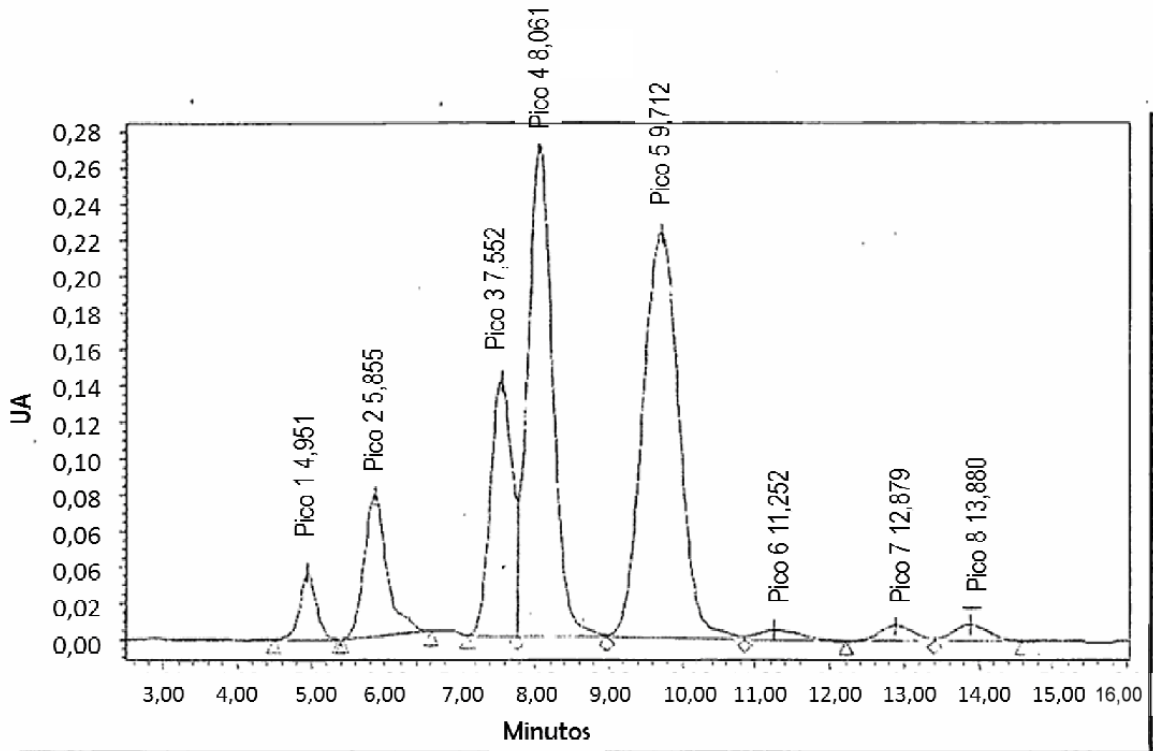


FIG 5A

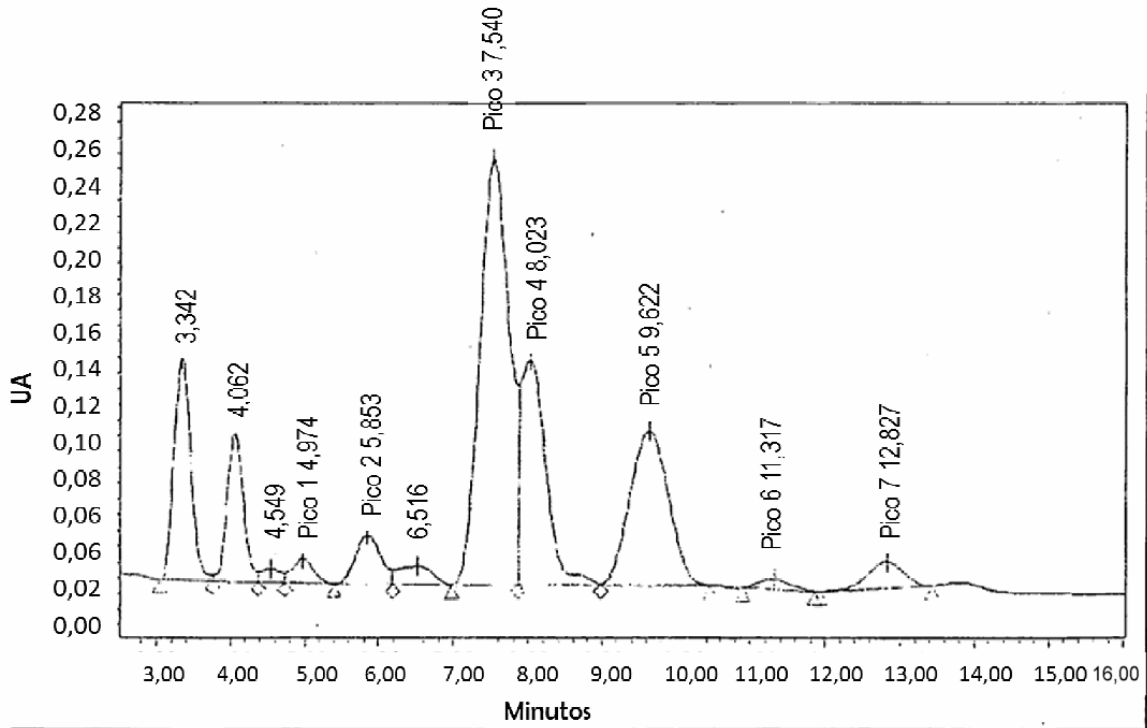


FIG 5B

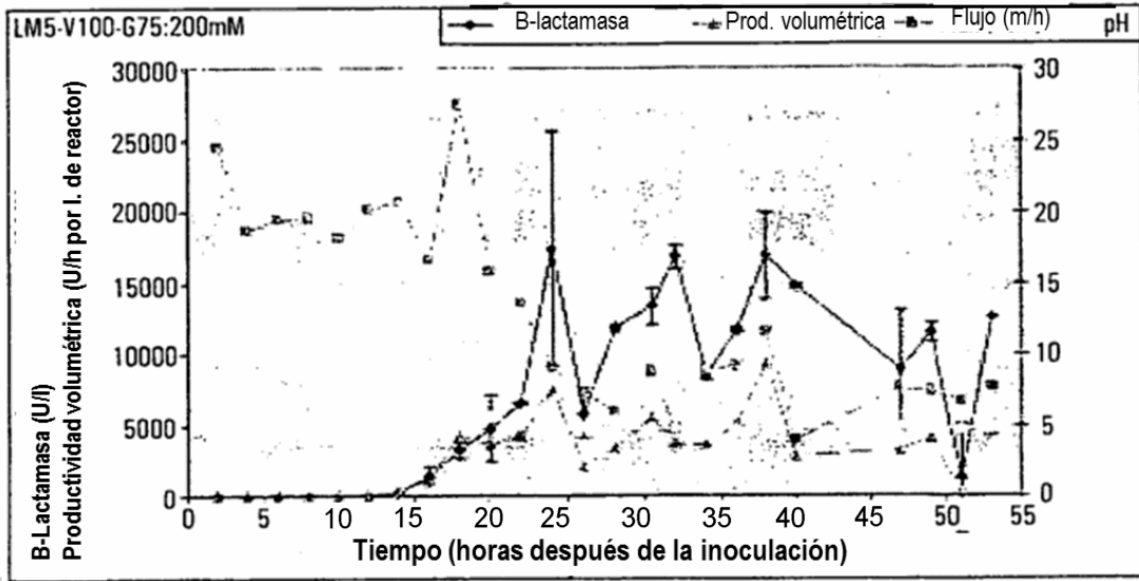


FIG 6A

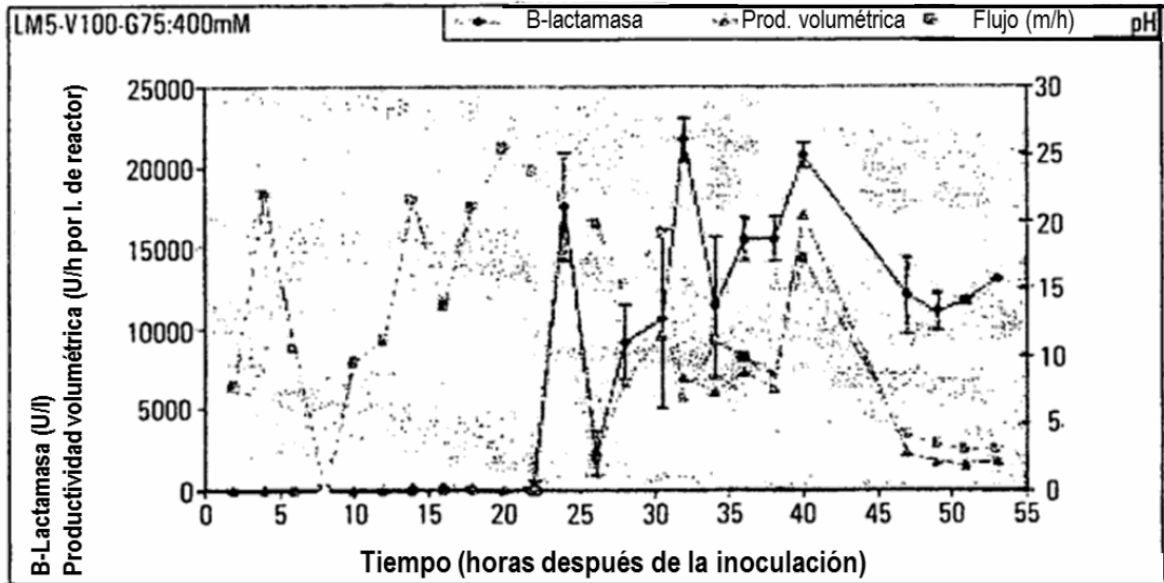


FIG 6B

Choque osmótico

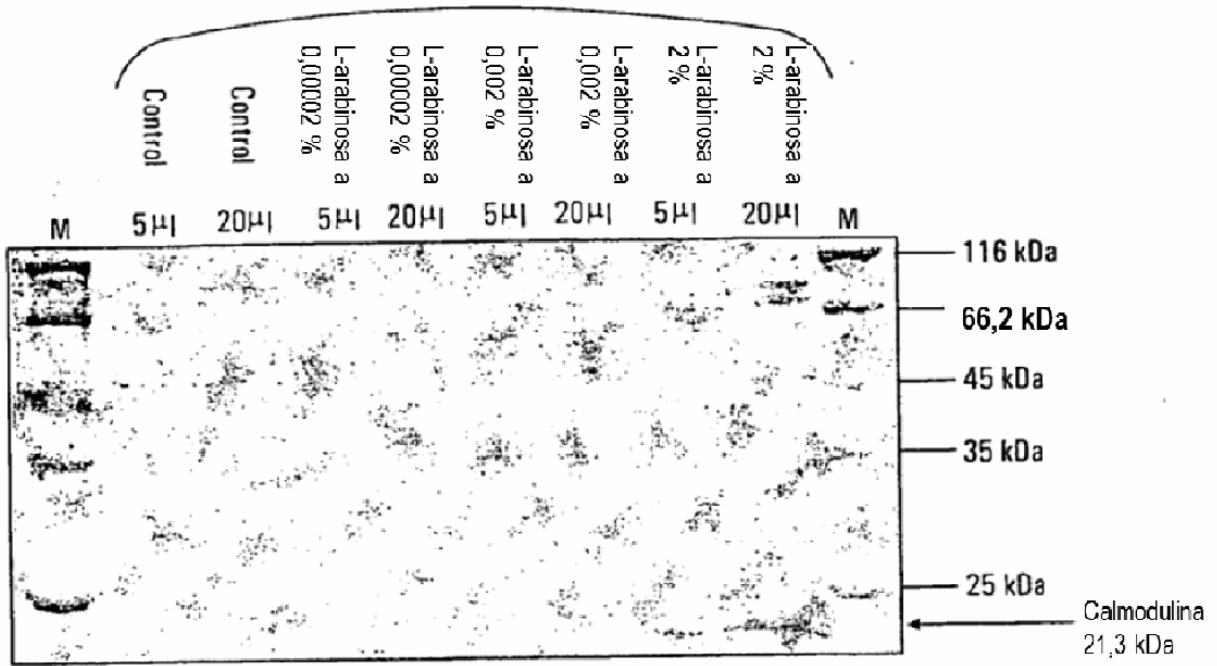


FIG 7A

Células completas Lisis celular – fracción soluble

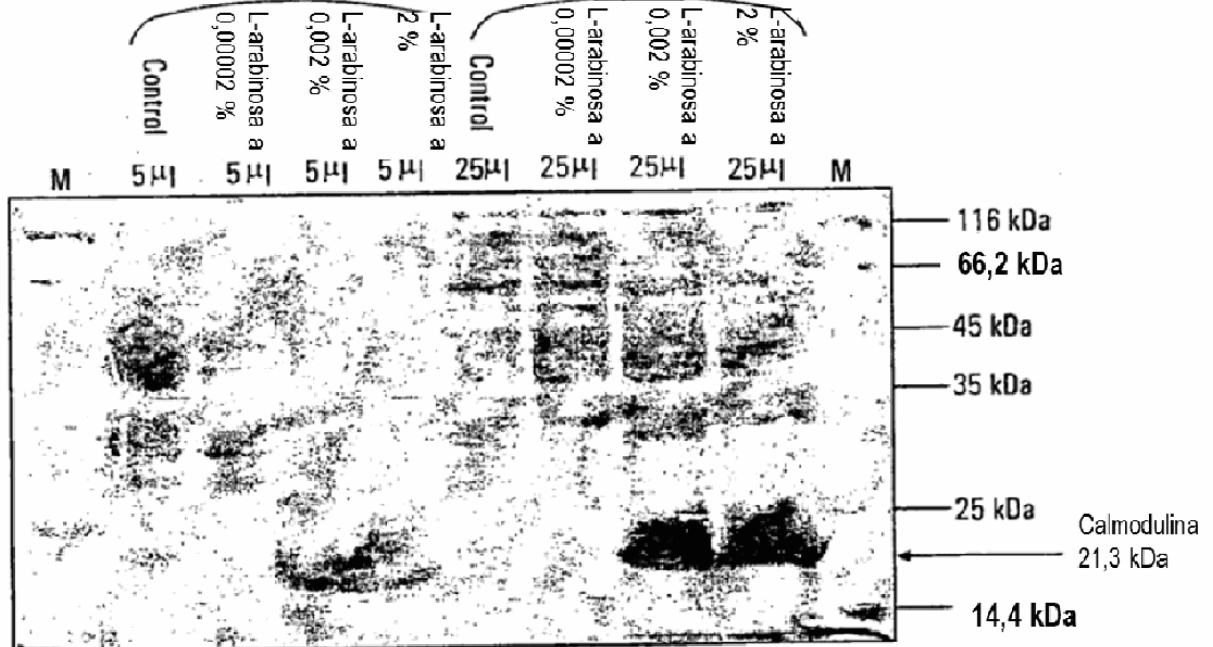


FIG 7B