

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 676 755**

51 Int. Cl.:

C12P 19/26 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.05.2010 PCT/EP2010/057129**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.12.2010 WO10136435**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.05.2010 E 10730105 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.05.2018 EP 2435578**

54 Título: **Producción biotecnológica de condroitina**

30 Prioridad:

25.05.2009 IT MI20090923

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

24.07.2018

73 Titular/es:

**ALTERGON S.A. (100.0%)
Via Dogana Vecchia 2
6900 Lugano, CH**

72 Inventor/es:

**DE ROSA, MARIO;
SCHIRALDI, CHIARA y
CIMINI, DONATELLA**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 676 755 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 biotecnológica de condroitina

Estado de la técnica

5 La condroitina es un polisacárido lineal natural formado por restos alternantes de N-acetil-D-galactosamina β 1: 4 y D-glucuronato β 1: 3. En vertebrados, la condroitina está presente en diversas formas sulfatadas originadas por la sulfatación de los restos 4 y 6 de hidroxilo de N-acetil-D-galactosamina y, en algunos casos, de los restos 2 y 3 de ácido glucurónico (Sugahara K y col., J. Biol. Chem., 1996, 271, 26745-54). El peso molecular de la condroitina y la extensión y los sitios de sulfatación dependen del tipo y de la edad de los tejidos (Kuettner KE y col., Eds., en Articular cartilage and osteoarthritis, NY, Raven Press, 1992; Volpi N Ed., en Chondroitin sulfate: structure, role and pharmacological activity, S. Diego, California Academic Press - Elsevier Inc, 2006). El sulfato de condroitina pertenece a la familia más amplia de glicosaminoglicanos, denominados GAG (Beaty NB, y Mello RJ, J. Chromatography and Biomedical Applications, 1987, 418, 187-222. Estos polisacáridos, unidos covalentemente a proteínas, como los proteoglicanos, son componentes ubicuos de la matriz extracelular de todos los tejidos conectivos, que realizan muchas funciones. (Ruoslathi E, Ann. Rev. Cell. Biol., 1988, 4, 229-255; Kjellen L y Lindahl U, Ann. Rev. Biochem., 1991, 60, 443-76).

Algunas bacterias patógenas producen una estructura capsular que sirve como factor de virulencia. En algunos casos, la cápsula está formada por GAG o estructuras relacionadas con el fin de engañar al sistema inmunitario durante la infección. Son ejemplos de estos patógenos *Pasteurella multocida* (DeAngelis PL, y col., Carbohydrate Res. 2002, 337(17), 1547-52; Harper M, y col., FEMS Microbiol. Lett., 2006, 265(1), 1-10; Leonov AV, y col., Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 2006, nov-dic (7), 94-7), cepas encapsuladas K4 y K5 de *E. coli* (Roberts IS, Ann. Rev. Microbiol. 1996, 50, 285-31; Bronner D, y col., J. Bacteriol. Sep. 1993;175(18):5984-92; Jann B y Jann K en Escherichia coli: Mechanisms of virulence. Cambridge Univ. Press. 1997; Whitfield C, Annu. Rev. Biochem. 2006, 75: 39-68. Stevens MP, y col., Mol. Microbiol. 1997, 24(5), 1001-12; Whitfield C y Roberts IS, Mol. Microbiol. 1999, 31, 1307-20; Ninomiya T, y col., J. Biol. Chem. 2002, 277(24), 21567-75) y algunas cepas de estreptococos capsulados Wessels MR, y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1991, 88, 19, 8317 -21; Tlapak-Simmons VL y col., J. Biol. Chem., 2005, 280, 13, 13012-18).

El sulfato de condroitina se usa como fármaco antiirreumático y condroprotector, con aplicaciones en el tratamiento de artrosis tibioperonea de la rodilla y artrosis del cartílago articular (Kuettner KE y col., Eds., en Articular cartilage and osteoarthritis, NY, Raven Press, 1992; Simànek V y col., 2005, 149, 51-56; Goerres GW y col., J. Clinical Desitometry 2005, 8, 484-487; Altman RD y col., OsteoArthritis and Cartilage 2005, 13, 13-19; Chan PS, y col., OsteoArthritis and Cartilage 2005, 13, 387-394; Chou MM, y col., Exp. Biol. Med. 2005, 230, 255-262; Clegg DO, y col., New England J. of Medicine, 2006, 23, 795-808; Roman-Blas y col., OsteoArthritis and Cartilage, 2006, 14, 839-848; Maheu E y col., OsteoArthritis and Cartilage, 2006, 14, 303-322; Fotini N y col., Biomed. Chromatogr. 2006, 20, 539-550; Lagnaoui R y col., Thérapie 2006, 61, 341-346; Volpi N Ed. en Chondroitin sulfate: structure, role and pharmacological activity, S. Diego, California Academic Press - Elsevier Inc, 2006; Zhang W y col., Ann. Rheum. Dis. 2007, 66, 377-388. En la actualidad, el sulfato de condroitina se obtiene mediante técnicas de extracción de diversas fuentes animales, como el cartílago de cerdo, aleta de tiburón y cartílago de teleósteos. La escasez de materia prima y la complejidad del procedimiento de purificación corriente abajo limitan la disponibilidad de este principio activo a nivel mundial, por lo que el mercado está controlado por la imposibilidad de satisfacer una demanda creciente. Además, en perspectiva, el sulfato de condroitina obtenido por extracción se puede excluir del mercado farmacéutico debido a las regulaciones cada vez más estrictas sobre la seguridad de las fármacos de origen animal, que se promulgan continuamente.

Por lo tanto, existe un interés creciente en desarrollar estrategias biotecnológicas alternativas para la producción de este tipo de polisacáridos, o sus precursores, por fermentación de microorganismos adecuados.

45 Informes existentes en la bibliografía científica (Rodríguez ML y col., Eur. J. Biochem., 1988, 177, 117-24; Manzoni M y col., Biotechnology Letters, 1996, 18, 383-6) y el la de patentes (WO 01/02597 A1) mostraron la posibilidad de obtener condroitina por fermentación, usando una cepa K4 de *E. coli* que produce un derivado de condroitina, el polisacárido K4, cuya cadena principal de carbono es idéntica a la condroitina, excepto por la adición de restos de β -fructofuranosa a nivel de C3 del ácido glucurónico. La condroitina puede obtenerse del polisacárido K4 mediante hidrólisis ácida controlada de restos de fructosa (documento US 6.288.044; US 6,777,398). Sin embargo, la producción de condroitina a partir del precursor K4 no se desarrolló como un procedimiento industrial real debido a los bajos rendimientos del precursor del polisacárido durante la fermentación, no superando, en el mejor de los casos, los 0,42 g·l⁻¹ (documento WO01/02597).

55 El documento U.S. 2005266460 y una serie de documentos de patente previamente publicados (WO 0180810, EP 1282684, EP 1832662, U.S. 20,030,104,601, U.S. 20050164984) describen el uso de condroitín sintasa de *Pasteurella multocida*, una enzima que cataliza la síntesis de condroitina a partir de los azúcares de UDP correspondientes. En particular, estos documentos reivindican el segmento de la secuencia de nucleótidos que codifica la enzima, la construcción y el uso de sistemas recombinantes (sistemas de expresión en procariotas y eucariotas) que expresan dicho segmento de la secuencia de nucleótidos y la producción de dichos sistemas

recombinantes de condroitina de diversos tamaños. Todos los documentos carecen de los datos experimentales sobre los procedimientos reivindicados, en particular, los datos sobre el modo de fermentación para producir enzimas y los rendimientos de condroitina en el procedimiento biotecnológico nunca se describen con detalle. Aproximadamente 10 años después de la primera prioridad, no se ha desarrollado ningún procedimiento industrial que se relacione con lo reivindicado.

El documento U.S. 20070015249 y el documento de patente previamente publicado U.S. 20030109693, describen la producción de una condroitín sintasa a partir de *E. coli* K4 y su uso para la producción *in vitro* de condroitina. La producción de la enzima, codificada por el gen *kfoC* de *E. coli* K4, localizado en la región II del grupo de genes responsable de la biosíntesis del antígeno capsular, se caracteriza por las siguientes etapas: amplificación de *kfoC*, clonación del gen en el vector pTrcHis y expresión de la cepa comercial TOP de *E. coli*. Los dos documentos también reivindican proteínas con mutaciones naturales o artificiales que pueden causar ligeros cambios estructurales de la condroitín sintasa sin alterar su función catalítica. Además, estos documentos carecen de datos sobre los rendimientos de los procedimientos de fabricación reivindicados, la producción de condroitín sintasa y la producción *in vitro* de condroitina a partir de los azúcares de UDP correspondientes.

El documento EP 1950308 y una serie de documentos de patente previos (WO 2007145197, WO 2007069693, WO 2007058252, WO 2007058252, WO 2007023867) describen procedimientos para la síntesis *in vitro* de condroitina y sus derivados usando condroitín sintasa de *E. coli* K4 y sus mutantes, que solo tienen una de las dos actividades transferasas.

El documento U.S. 7,273,729 y una serie de documentos de patente previos (JP 2004024208, US 20060052335, US 20060057697, US 7,232,676) describen el uso de la condroitín sintasa humana, una enzima que cataliza la síntesis de condroitina a partir de los azúcares de UDP correspondientes. Los documentos reivindican la estructura de la condroitín sintasa humana, de un vector de expresión que comprende la secuencia de la enzima, la expresión de dicho vector en células eucariotas y un procedimiento para sintetizar la cadena de polisacáridos de la condroitina.

El documento U.S. 20070059805 reivindica la estructura de la condroitín sintasa humana, de un vector de expresión que comprende la secuencia de la enzima, la expresión de dicho vector en células eucariotas y un procedimiento para sintetizar la cadena de polisacáridos de la condroitina.

Todos los documentos mencionados anteriormente no resuelven el problema de la producción de condroitina a costes competitivos en comparación con el sulfato de condroitina obtenido por extracción de fuentes animales. En particular, la producción por fermentación utilizando *E. coli* K4, *Pasteurella multocida* y sus mutantes de condroitín sintasa, se caracteriza por rendimientos que no superan los 0,5 g.l⁻¹ en el caldo de fermentación. De manera similar, los procedimientos biotecnológicos que, como sustrato, utilizan condroitín sintasa de *E. coli* K4, de *Pasteurella multocida* o de seres humanos y sus mutantes, tienen altos costes asociados a la producción de enzimas y al uso de azúcares de UDP.

Por lo tanto, el problema de producir condroitina a costes compatibles con las necesidades del mercado sigue sin soluciones prácticas.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento para la preparación de condroitina según la reivindicación 1, un procedimiento para la preparación de sulfato de condroitina según la reivindicación 15, y una cepa K4 de *Escherichia coli* modificada por ingeniería genética según la reivindicación 16 de las reivindicaciones adjuntas.

Sorprendentemente, se descubrió que la condroitina puede producirse por fermentación, obteniendo rendimientos > 8 g l⁻¹ utilizando una estrategia integrada basada en la optimización de un procedimiento de fermentación en tres fases (discontinua - semidiscontinua - en régimen de microfiltración) y bacterias de *E. coli* K4 modificadas genéticamente. Dichas bacterias son cepas de *E. coli* K4 modificadas genéticamente, por lo que el objetivo del procedimiento de modificación por ingeniería genética es mejorar la procesividad de todo el complejo enzimático responsable de la síntesis del polisacárido K4, insertando copias múltiples del gen RfaH autólogo, que actúa como regulador positivo de la transcripción del grupo de genes responsable de la síntesis del material capsular.

Los altos rendimientos, la facilidad del procedimiento de purificación corriente abajo desarrollado, el bajo coste total del procedimiento y el bajo impacto ambiental, hacen que estos hallazgos sean superiores a las estrategias biotecnológicas descritas anteriormente (Rodríguez ML y col., Eur. J. Biochem., 1988, 177, 117-124; Manzoni M y col., Biotechnology Letters, 1996, 18, 383-386; WO 01/02597 A1; US 6,288,044; US 6,777,398; US 2,005,266,460; WO 01/80810; EP 1282684; EP 1832662; US 20,030,104,601; US 20,050,164,984; US 20,070,015,249; US 20,030,109,693; EP 1950308; WO 2007145197; WO 2007069693; WO 2007058252; WO 2007058252; WO 2007023867; US 7,273,729; JP 2004024208; US 20,060,052,335; US 20,060,057,697; US 7,232,676; US 20,070,059,805).

El procedimiento de fermentación desarrollado, integrado con una estrategia de sulfatación química de condroitina selectiva de sitio, hace que el procedimiento biotecnológico reivindicado sea competitivo en comparación con los procedimientos convencionales de extracción de sulfato de condroitina a partir de materias primas de origen animal,

que pueden retirarse del mercado farmacéutico debido a cambios recientes en las regulaciones sobre la seguridad del producto.

Descripción detallada de la invención

5 Según la reivindicación 1, la presente invención se refiere a un procedimiento para la preparación de condroitina a partir del precursor polisacárido capsular bacteriano K4, caracterizado porque la bacteria *E. coli* K4 comprende múltiples copias modificadas por ingeniería genética de:

- (i) una secuencia que codifica la proteína rfaH de *E. coli*, o
- (ii) una secuencia capaz de hibridarse con la secuencia codificante de rfaH de *E. coli* en las siguientes condiciones rigurosas: 1,2-1,8 x HPB a una temperatura comprendida entre 40 y 50 °C,

10 se cultiva y amplifica, seguido de tratamiento hidrolítico en el caldo de fermentación empobrecido sin biomasa, permitiendo la conversión de polisacárido K4 en condroitina y fructosa.

La presente invención describe un procedimiento de fermentación que, utilizando bacterias de *E. coli* K4 modificadas genéticamente, así como condiciones de cultivo especiales, permite la producción de polisacáridos capsulares, precursores de condroitina (condroitina fructosilada en ácido glucurónico en posición 3) y obtener rendimientos superiores a 8 g.l⁻¹, es decir, aproximadamente 20 veces más de lo descrito hasta ahora.

Esta estrategia se caracteriza por las siguientes fases:
 un procedimiento de fermentación de múltiples etapas (discontinua, semidiscontinua, en régimen de microfiltración), que emplea una cepa recombinante de *E. coli* K4 caracterizada por la presencia de copias múltiples del gen RfaH autólogo (Santangelo y Roberts T. J Mol Cell 9 de abril de 2002 (4): 698-700) que es un regulador positivo de la transcripción del grupo de genes responsable de la síntesis del material capsular; tratamiento hidrolítico realizado directamente en el caldo de fermentación empobrecido sin biomasa, que permite la conversión del polisacárido K4 en condroitina y fructosa y la desintoxicación simultánea del sobrenadante de fermentación por escisión del lipopolisacárido (LPS), producido en grandes cantidades por el microorganismo, en cadena O y lípido A, que inmediatamente precipita, permitiendo su fácil eliminación; un procedimiento innovador de purificación corriente abajo basado en procedimientos de membrana capaces de separar la cadena O de la condroitina de otros contaminantes presentes en el medio de cultivo.

El procedimiento reivindicado es creativo e innovador en comparación con la técnica anterior, porque es el único que permite la implementación de procedimientos a escala industrial para la producción de condroitina, un polisacárido de gran potencial para el mercado farmacéutico, para lo cual, hasta ahora, no se han logrado procedimientos de producción, extracción o biotecnológicos. Asimismo, el procedimiento reivindicado, integrado con una estrategia de sulfatación de condroitina selectiva de sitio, ahora hace posible satisfacer la creciente demanda de sulfato de condroitina que proviene del mercado, eludiendo los problemas de las estrategias de producción actuales basadas en la extracción y asociadas al uso de fuentes animales.

Modificación de cepas bacterianas mediante ingeniería genética

35 *E. coli* K4 de tipo silvestre (wild type, wt) (Eck4wt) - Se conocen muchas cepas de *E. coli*, todas ellas encapsuladas, categorizadas en cuatro grupos serológicos diferentes en función de los determinantes antigénicos capsulares (hasta ahora se conocen aproximadamente 80 determinantes antigénicos) y de criterios físicos, bioquímicos y genéticos. Las cápsulas del grupo 1 y 4 pertenecen a cepas de *E. coli* responsables de infecciones intestinales, incluidas cepas enteropatógenas (EPEC), enterotoxigénicas (ETEC) y enterohemorrágicas (EHEC). Las cápsulas del grupo 1 están formadas por polisacáridos que son ácidos debido a la presencia de ácidos urónicos con estructuras muy similares. En cambio, las estructuras capsulares del grupo 4 son muy diferentes y se caracterizan por la presencia de amino azúcares N acetilados en sus unidades repetitivas. Las cápsulas de los grupos 2 y 3 pertenecen a cepas de *E. coli* responsables de infecciones extraintestinales (ExPEC). Eck4wt, el microorganismo sometido a modificación genética por sobreproducción del polisacárido K4, pertenece al grupo serológico 2 y está disponible con diferentes códigos en los principales bancos de microorganismos, tales como la American Type Culture Collection, USA (ATCC 23502), el International Escherichia Centre, Dinamarca (cepa Bi 8337/41), la National Collection of Type Cultures, UK (cepa NCTC 9005) y la colección Freiburg (cepa U1-41 2616).

Sorprendentemente, se descubrió que la Eck4wt lleva un plásmido endógeno, de ahora en adelante identificado con el acrónimo PK4, cuya presencia en *E. coli* K4 no está descrita en la bibliografía.

50 pK4 consiste en aproximadamente 93.000 bases, es constitutivo y se caracteriza porque comprende secuencias que pueden utilizarse para insertar las secuencias ID NO: 1 y/o ID NO: 6 del gen heterólogo. En promedio, está presente en 1-5 copias/célula y sus modificaciones genéticas son estables.

55 RfaH, el regulador transcripcional del grupo de genes responsable de la síntesis del material capsular. La transcripción de operones policistronicos largos en bacterias a menudo se basa en proteínas accesorias, cuyos mecanismos moleculares aún se desconocen. Por ejemplo, la transcripción de una sola molécula de ARNm de las regiones 2 y 3 del grupo de genes responsable de la síntesis de los componentes moleculares de la cápsula está

controlada por una proteína codificada por el gen *rfaH* de antiterminación, que por tanto funciona como un regulador positivo de la transcripción, impidiendo la interrupción prematura de las transcripciones. Al aumentar la capacidad de procesamiento de la ARN polimerasa, la proteína codificada por el gen *RfaH* activa la transcripción de varios genes responsables de la virulencia y la fertilidad de las bacterias entéricas (Stevens MP y col., Mol. Microbiological., 1997, 24, 1001-12). En general, la proteína codificada por el gen *RfaH* es necesaria para la biosíntesis del núcleo de lipopolisacárido de *E. coli* y *S. typhimurium* (Pradel E y Schnaitman CA, J. Bacteriol., 1991, 173, 6428-31; Brazas R, y col., J. Bacteriol. 1991, 173, 6168-73), para la síntesis y secreción de α -hemolisina (Bailey MJA y col., Mol. Microbiol. 1992, 6, 1003-10) y para la producción del factor sexual F (Beutin L y Achtman MJ, Bacteriol. 1979, 139, 730-37). Además, Zhang y colaboradores (Zhang L y col., Infect. Immuno. 2004, 72, 7282-93) indican que, en general, la expresión de antígenos capsulares del grupo serológico 2, requiere la proteína codificada por el gen *rfaH* y demostraron que dicha proteína era necesaria para la transcripción de la región 2 del grupo de genes responsable de la síntesis del polisacárido capsular en *E. coli* K5. Rahn y Whitfield (Rahn A y C. Whitfield, Mol. Microbiological. 2003, 47, 1045-60) demostraron que, en *E. coli* K30 del grupo serológico I, para la síntesis de la cápsula, la transcripción del grupo se modula mediante un mecanismo de antiterminación ejercido por el gen *RfaH*.

El papel esencial del gen *RfaH* y de la proteína correspondiente en el procedimiento de síntesis de los componentes capsulares, se demuestra indirectamente mediante estudios que implican deleciones o alteraciones de este gen. En particular, Nagy y colaboradores (Nagy G, y col., Infect. Immun. 2002, 70, 4406-13) indican que la deleción del gen *rfaH* del genoma de la cepa uropatógena de *E. coli* 536, reduce drásticamente la virulencia en ratones, desde un 100% de mortalidad inducida por la cepa de tipo silvestre hasta un 18% por la cepa mutante. La eliminación del gen *RfaH* también determina una alteración del fenotipo LPS y una reducción de la producción de cápsula K15 y α -hemolisina. Stevens y colaboradores (Stevens MP y col., FEMS Microbiol. Lett., 1994, 124, 93-8) demuestran que la introducción de mutaciones en la secuencia del gen *rfaH* desactiva la producción de cápsulas a 37 °C en células de *E. coli* K5.

Por el contrario, en la bibliografía no hay datos disponibles sobre el efecto de la sobreexpresión de *rfaH*.

En la cepa Eck4wt, el gen *rfaH* está bajo el control de un promotor regulado, que determina la expresión máxima durante la fase de crecimiento estacionario (Stevens MP, y col., Mol. Microbiol., 1997, 24, 1001-12; Stevens M. P., y col., FEMS Microbiol. Lett., 1994, 124, 93-98).

Sorprendentemente, se descubrió que la integración de más de una copia del gen *rfaH* en el material genético de bacterias tales como *E. coli*, especialmente Eck4wt, mejoraba considerablemente la producción del polisacárido K4. Para lograr una transcripción más eficaz, el gen de *rfaH* integrado puede colocarse bajo el control de un promotor, tal como pGap, que es preferentemente eficaz en todos los estadios de crecimiento, y que es un promotor constitutivo del gen *GapA* que codifica la gliceraldehído-3-P-deshidrogenasa (GAPDH), que es una enzima clave necesaria para el metabolismo de *E. coli*. En particular, El promotor pGap está organizado en una región de múltiples promotores compuesta por los promotores P1, P2, P3 y P4. De aquellos, el promotor P1 es el más fuerte, aunque los cuatro promotores actúan sinérgicamente para garantizar la transcripción de genes en diferentes condiciones, haciéndolo más versátil y eficaz. Pueden utilizarse incluso otros promotores constitutivos que son activos en *E. coli*.

Por lo tanto, otro objeto de la invención es una cepa K4 de *Escherichia coli* modificada por ingeniería genética, caracterizada porque comprende múltiples copias de un gen *rfaH* modificado por ingeniería genética, como alternativa o en combinación, en el ADN cromosómico, elementos plasmídicos o elementos transponibles, en el que la secuencia codificante de la proteína *rfaH* es:

- (i) una secuencia que codifica la proteína *rfaH* de *E. coli*, o
- (ii) una secuencia capaz de hibridarse con la secuencia codificante de *rfaH* de *E. coli* en las siguientes condiciones rigurosas:

1,2-1,8 x HPB a una temperatura comprendida entre 40 y 50 °C. Según una realización preferida, la secuencia que codifica la proteína *rfaH* se coloca bajo el control de un promotor constitutivo o comprende al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 20. Sorprendentemente, se descubrió que, a partir de estas bacterias modificadas por ingeniería genética, podían obtenerse altos rendimientos de polisacárido K4 utilizando un procedimiento de fermentación llevado a cabo en tres etapas secuenciales: discontinua, semidiscontinua y en régimen de microfiltración.

La primera fase *discontinua* dura hasta que se produce una disminución en la tasa de crecimiento microbiano (μ) como resultado del empobrecimiento de nutrientes, lo que conduce a un aumento simultáneo de pO_2 .

La segunda fase *semidiscontinua* se caracteriza críticamente por un perfil de alimentación que utiliza una solución concentrada de nutrientes que da soporte al crecimiento microbiano a una tasa que es menor que la máxima. En particular, la estrategia de fermentación reivindicada implica la posibilidad de que se optimice automáticamente la adición de nutrientes al conducir la alimentación con variaciones de parámetros de fermentación típicamente correlacionados con condiciones de disponibilidad de nutrientes, como la presión parcial de O_2 o el pH del medio de cultivo. Esta estrategia se implementa creando circuitos de control con un programa informático especializado que

garantice, en función de parámetros optimizados de controladores PID, ajustes en tiempo real para cumplir con los requisitos nutricionales de crecimiento microbiano, prolongando así la fase de crecimiento e impidiendo que se produzcan fenómenos de desbordamiento del metabolismo que podrían conducir a la acumulación en el medio de ácidos orgánicos inhibidores del crecimiento (en el caso de EckK4, una concentración de ácido acético $> 5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ inhibe el crecimiento).

La tercera fase, denominada régimen de microfiltración, se activa cuando la acumulación de catabolitos tóxicos se ralentiza o detiene el crecimiento, incluso en presencia de nutrientes disponibles. Este procedimiento implica la microfiltración del medio de cultivo utilizando módulos de microfiltración colocados dentro o fuera del biorreactor. Durante la microfiltración, el volumen fermentado se mantiene constante mediante un controlador de nivel, que restablece automáticamente el volumen del microfiltrado eliminado mediante la adición de solución salina con una composición compatible con la utilizada para la preparación del medio. Al final del procedimiento fermentación, el polisacárido K4 está presente parcialmente en el microfiltrado y parcialmente en el fermentador.

Crecimiento discontinuo - La liberación de polisacárido K4 en el medio de cultivo es una característica constitutiva de EckK4r y EckK4wt, mientras que el rendimiento de la biomasa y la productividad (polisacárido K4/biomasa) dependen de la composición del medio de cultivo y de las condiciones de fermentación.

Nutrientes - Para la producción de polisacárido K4, para el crecimiento de EckK4r y EckK4wt, pueden utilizarse medios de cultivo con diferente composición; por ejemplo, como fuentes de carbono puede utilizarse glucosa, dextrina, almidón, glicerol, licor de maceración de maíz y melazas, y como fuentes no animales de nitrógeno orgánico y nutrientes complejos puede utilizarse peptona, extracto de levadura, hidrolizado de caseína, triptona y soja, algodón y harinas de guisante. Sin embargo, la relación entre la fuente de carbono y la fuente de nitrógeno orgánico en el medio de cultivo es crítica para una producción eficaz (polisacárido K4/biomasa). En particular, la disminución de la cantidad de nitrógeno orgánico en el medio de cultivo da como resultado una menor capacidad de crecimiento del microorganismo, asociado a una mayor capacidad para producir el polisacárido K4. Dado que este segundo efecto supera al primero, se observa una mayor productividad (polisacárido K4/l de fermentación) en medios semidefinidos pobres en fuentes complejas.

Oxigenación: la oxigenación del medio de cultivo no tiene efectos críticos sobre el crecimiento del microorganismo y la producción de polisacárido K4, siempre que se impidan condiciones de anoxia estricta, asegurando al menos una saturación $pO_2 > 5\%$ en oxígeno puro. pH - el crecimiento se produce entre un pH de 3 y 10, mientras que el intervalo de pH 6-8 es óptimo para el crecimiento del microorganismo y para la producción de polisacárido K4. Por lo tanto, el pH del medio de cultivo se mantiene automáticamente dentro de este intervalo de pH con un sistema de pH estático.

Temperatura - el crecimiento del microorganismo y la producción de polisacárido K4 se produce en el intervalo de $25-40^\circ \text{C}$, con un rendimiento máximo a 37°C .

Fase de crecimiento - El microorganismo libera el polisacárido K4 en el medio de cultivo, parcialmente en la fase de crecimiento exponencial y completamente en la fase estacionaria.

Crecimiento en matraz y fermentador- En condiciones de crecimiento comparables, el crecimiento en fermentador da rendimientos 4 veces mayores (polisacárido K4/l de fermentación) en comparación con el crecimiento en matraz.

Crecimiento semidiscontinuo - Sorprendentemente, se descubrió que las estrategias de alimentación impedían el metabolismo de desbordamiento, obtenido manteniendo la adición de nutrientes recientes por debajo de la tasa crítica de absorción de sustrato, mejorando los rendimientos de biomasa y polisacárido K4. Por ejemplo, esto se puede conseguir con una estrategia de fermentación en la que la alimentación de nutrientes se coloca bajo el control de la concentración de oxígeno disuelto en el reactor, que debe mantenerse a una pO_2 de 30%. Esto se logra de forma rápida y reproducible mediante un controlador PID conectado a la bomba de alimentación que suministra una solución de nutrientes concentrada (por ejemplo, glicerol-soja o glucosa-extracto de levadura). De hecho, la adición de una fuente de carbono al biorreactor conduce a la disminución de la TOD (Tensión de Oxígeno Disuelto). Por lo tanto, al final de la fase de fermentación discontinua, especialmente cuando el valor de pO_2 empieza a aumentar, comienza una fase de alimentación de suministro de nutrientes concentrados y restablece la pO_2 al valor de ajuste, con baja deriva (-20% de ajuste de pO_2). Cuando el valor de pO_2 alcanza el punto de ajuste, la bomba de alimentación se detiene automáticamente y desconecta la alimentación, hasta que la fuente de carbono en el caldo de fermentación se empobrezca, produciendo un aumento repentino del valor de pO_2 y desencadenando un nuevo ciclo como se describió anteriormente. después, la fase de alimentación prosigue automática y secuencialmente según los requisitos nutricionales del cultivo bajo control metabólico. Una estrategia similar de conducción de la alimentación se puede activar trabajando sobre variaciones de pH; en este caso, para el ajuste del pH, es necesario excluir el sistema automático de pH estático, la alimentación se insertará a través de un interruptor de encendido de la bomba de aducción cuando el pH aumente por encima de un umbral predefinido, basado en la fisiología del microorganismo (por ejemplo, pH 7,8).

Crecimiento en régimen de microfiltración: Es posible prolongar la fase de crecimiento del microorganismo y la producción de polisacárido K4 mediante un procedimiento de microfiltración que elimina los componentes tóxicos

que se acumulan en el medio de fermentación. El procedimiento de microfiltración se lleva a cabo con una unidad externa, fabricada preferentemente de fibras huecas, que funciona en un régimen de microfiltración tangencial, que reduce el ensuciamiento de los filtros de membrana y mantiene un alto flujo transmembrana. El volumen del microfiltrado se restablece automáticamente con solución salina con una composición idéntica a la del medio de cultivo, usando un control de nivel. Durante el procedimiento de microfiltración, se añaden nutrientes en forma de solución concentrada, según un perfil de alimentación que limita la tasa de crecimiento. Esto permite impedir que se produzcan fenómenos de *desbordamiento* metabólico no deseados y la pérdida de nutrientes en la corriente de salida (eluido) del medio de cultivo microfiltrado.

Estas condiciones dan como resultado una dilución continua de componentes solubles del medio de fermentación, por lo tanto, parte de la condroitina producida se encuentra en el infiltrado. El infiltrado obtenido en la tercera fase del procedimiento de fermentación, en régimen de microfiltración, contiene bajos niveles de contaminantes macromoleculares (por ejemplo, proteínas, LPS, etc.) debido a la resistencia de la membrana (R_m) y a la resistencia de la torta (R_t) que se forma en la membrana. Por lo tanto, es posible tratar dicho infiltrado directamente en la membrana de ultrafiltración (UF), evitando un tratamiento previo con proteasas, que en cambio se requiere para el caldo de cultivo empobrecido después de la eliminación del componente celular. Como alternativa, el infiltrado de microfiltración se añade al caldo de cultivo empobrecido sin componente celular.

Purificación de condroitina del caldo de fermentación

Separación de biomasa - Al final del procedimiento de fermentación, la eliminación de biomasa se puede lograr mediante microfiltración o centrifugación o mediante el uso de filtración en tierra a través de filtros de placa de tipo FUNDA.

Eliminación de biomasa por microfiltración - El procedimiento de microfiltración continúa hasta el final del procedimiento de fermentación, interrumpiendo la adición de solución salina. Cuando la cantidad de biomasa en el microfiltrado alcanza el valor máximo compatible con el procedimiento (300-400 g de biomasa húmeda l^{-1} , correspondiente a una concentración 3-5 veces el volumen de caldo de fermentación), se añade un volumen de agua desionizada y la microfiltración continúa; repitiéndose esta etapa de lavado al menos 3 veces. Todos los infiltrados producidos durante la fermentación y los asociados con la eliminación de biomasa (medio acelular) se agrupan y se someten a las etapas posteriores del procedimiento corriente abajo.

Como alternativa, el caldo de cultivo puede recogerse en un recipiente desinfectado y procesarse en un sistema automatizado específico de microfiltración de flujo cruzado, utilizando casetes o preferentemente fibras huecas con un límite entre 0,22 y 0,6 μm . En este caso, las condiciones de funcionamiento implican una T comprendida entre 15 ° C y 40 ° C, una presión transmembrana entre 0,8 y 1,2 atm y una capacidad de recirculación de flujo tangencial de 40-100, $l (min \cdot m^2)^{-1}$. La imposición de un Δp más alto ($\geq 0,5$ atm) produce un aumento del flujo transmembrana y tiempos de tratamiento más cortos, pero causa la formación de una torta más densa que impide la recuperación completa del polisacárido K4 en el eluido.

Eliminación de biomasa por centrifugación - Al final de la fermentación, la biomasa se separa del caldo de cultivo mediante centrifugación continua. Si previamente no se ha ultrafiltrado, el caldo de cultivo recuperado se añade al infiltrado de microfiltración antes de realizar las fases posteriores del procedimiento corriente abajo.

Eliminación de biomasa por filtración en tierra

Por cada litro de caldo, se añade una cantidad de filtro de tierra (preferentemente Celite) que es igual a 4-8 veces el peso de la biomasa húmeda en el caldo, después, la suspensión se suministra a un filtro de placa de tipo FUNDA y se filtra a presión (3-6 bar). El caldo clarificado ($DO_{600} \leq 0,1$) se puede tratar para la degradación proteica posiblemente después de la microfiltración a través de cápsulas de microfiltración asimétricas especiales (por ejemplo, GE de 0,6 a 0,2 μm).

Degradación hidrolítica de proteínas - Para la desproteínización del medio de cultivo que contiene el polisacárido K4, se añaden una o más enzimas proteolíticas, preferentemente proteasas fúngicas (*Aspergillus oryzae* 2-6 $U l^{-1}$) y se deja actuar durante un tiempo de duración dependiente de la temperatura utilizada (1-3 h a 25-37 ° C, 8-20 h a 4 ° C).

Ultrafiltración-diafiltración - El material fermentado, sin componente celular y desproteínizado, se ultrafiltra utilizando sistemas manuales o automáticos de ultrafiltración (UF) tangencial equipados con membranas ensambladas como módulos de casete o fibra hueca, fabricadas con material compatible con el procedimiento, preferentemente poliétersulfona o polipropileno, con un límite de 50-300 KDa, preferentemente 100 KDa y con un área comprendida entre 0,02 y 0,05 m^2 por litro a tratar. Los ejemplos de intervalos operativos de los parámetros del procedimiento de UF son: capacidad de recirculación de flujo tangencial 4 - 10 $l \cdot min^{-1}$; presión transmembrana 0,5 - 1,4 atm; temperatura 20 -40 ° C; pH 4-8. El caldo de cultivo sin células y desproteínizado, posiblemente complementado con el infiltrado de la fase de fermentación, si no se trató por separado, se concentra hasta 10-20 veces el volumen inicial para eliminar los contaminantes de bajo peso molecular (sales, péptidos, nutrientes residuales). Posteriormente, el concentrado se diafiltra con agua desionizada o ultrapura (AUP 2-5 volúmenes) para completar la eliminación de componentes de bajo peso molecular.

Tratamiento ácido - El concentrado se somete a hidrólisis ácida con la doble finalidad de desfructosilar el

polisacárido K4, formando condroitina y fructosa, y desintoxicando el lipopolisacárido LPS, separando el componente polisacárido (cadena O) del componente lipídico (lípidos A) que precipita. Son ejemplos no exhaustivos de condiciones hidrolíticas utilizadas: ácido acético de 0,5 a 3,0 % (v/v), pH 2-4, temperatura 60-100 °C, tiempo de hidrólisis 1-3 h. Después de la eliminación del componente lipídico de LPS por centrifugación, filtración o microfiltración, la solución llevada a un pH neutro y mezclada con un volumen equivalente de una solución de NaCl 0,1-0,2 M, se concentró-diafiltró de nuevo.

Como alternativa, la hidrólisis ácida (4-5 % de ácido acético pH<3, 1-3 h a 100 °C) puede realizarse después de la desproteización en el caldo clarificado no concentrado. Este procedimiento experimental también da como resultado la hidrólisis de lipopolisacáridos con la liberación posterior de lípidos A y su precipitación, así como en la desfructosilación del polisacárido K4, generando así condroitina.

Después de la hidrólisis, el caldo de cultivo se enfría y se centrifuga, el sobrenadante se ajusta a pH 7, se complementa con NaCl y después se concentra y diafiltra para eliminar la cadena O y los componentes residuales del medio.

Las membranas utilizadas (módulos de casete o fibra hueca) se fabrican con material compatible con el procedimiento, preferentemente polipropileno o poliétersulfona, y tienen un límite de 10-100 kDa, preferentemente de 50 kDa, y un área de filtro de 0010-0005 m² por litro a tratar. El tamaño de la membrana es limitado ya que la desfructosilación implica aproximadamente un 30 % de diferencia entre el peso molecular del polisacárido K4 y el de la condroitina, por lo tanto, el intervalo de límite molecular seleccionado permite una buena recuperación, mientras se mantiene el efecto de purificación de contaminantes de bajo peso molecular (acetato de sodio, otras sales, restos peptídicos, cadenas O). Los ejemplos de intervalos operativos de los parámetros del procedimiento de UF son: Capacidad de recirculación de flujo tangencial 4-10 l min⁻¹; presión transmembrana 0,8-1,4 atm; temperatura 20-40 °C, pH 5-8. El sobrenadante se concentra hasta 3-5 veces el volumen inicial para eliminar la mayoría de los contaminantes de bajo peso molecular (fructosa, cadenas O, sales) después se diafiltra con agua desionizada (5,2 volúmenes) para completar la eliminación del componente de bajo peso molecular, e impulsar la separación de las cadenas O (10-15 kDa) de la condroitina desfructosilada (30-50 kDa). Recuperación de condroitina - La condroitina presente en el retenido se puede recuperar ya sea: a) mediante precipitación con disolventes orgánicos (2-5 volúmenes de etanol al 95 % v/v o acetona en presencia de cloruro de sodio 0,1-0,3 M) y posterior deshidratación con calor al vacío; b) mediante liofilización; c) mediante secado por pulverización.

El procedimiento corriente abajo reivindicado permite recuperar > 80 % del valor teórico y conduce a la producción de condroitina con una pureza > 95 % con un contenido de endotoxina reducido por un factor > 10⁴, un contenido proteico <0,05 % y un PM de 30-50KD. Los siguientes ejemplos describen la construcción de sobreproductores recombinantes de polisacárido K4, la estrategia de fermentación y el procedimiento corriente abajo de purificación de condroitina.

PARTE EXPERIMENTAL

Ejemplo 1. Construcción de Eck4r1 recombinante.

La estrategia utilizada para la construcción de Eck4r1 recombinante (*E. coli* K4 recombinante 1) implica la integración, en las copias múltiples (1-5) del plásmido PK4 endógeno de Eck4wt (*E. coli* K4 de tipo silvestre), de un casete de expresión que contiene el gen *rfaH* bajo el control de pGapP1 (promotor parcial P1 constitutivo del gen que codifica la gliceraldehído-3-P deshidrogenasa, GAPDH) para obtener la transcripción constante del gen *rfaH* a lo largo de la fase de crecimiento. A) Construcción del casete de inserción.

1) Extracción de ADN genómico de Eck4wt - El kit DNeasy Blood & Tissue suministrado por Quiagen se utiliza para la extracción de ADN genómico de Eck4wt, siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante.

2) Adaptación del casete de integración - Una ADN polimerasa de alta fidelidad (Expand High Fidelity PCR System, Roche), con una tasa de error reducida durante la amplificación, se utiliza en todas las reacciones de PCR. Todas las etapas de amplificación se realizan según el mismo protocolo, que incluye: 50-100 ng de material de partida; cebador Up (corriente arriba) a una concentración final de 200mM; cebador Dw (corriente abajo) a una concentración final de 200mM; Tampón Taq 1X; 1 U Taq; H₂O milliQ ultrapura a un volumen final de 50 µl. En la Tabla 1 se enumeran todos los cebadores utilizados en experimentos de amplificación.

3) Amplificación del casete funcional (fragmento I) - El casete proporcionado en el kit se amplifica utilizando el par de cebadores pK4_up y FRT_dw (Tabla 1). El oligo pK4_up contiene una región de 50 pb similar a la porción 5' del plásmido PK4, en la que el acontecimiento de recombinación está destinado a ser la diana. El perfil de PCR utilizado fue: 94 °C durante 2'; 25 ciclos: 94 °C durante 1', 56 °C durante 1', 72 °C durante 2'; 72 °C durante 30".

4) Amplificación del promotor Pgap (P1) (fragmento II) - Como molde para la amplificación del promotor de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, se utiliza ADN cromosómico de Eck4wt. Para la reacción PCR los cebadores pGap_up y pGap_dw (Tabla 1) se utilizan según el siguiente perfil: 94 °C durante 2'; 25 ciclos: 94 °C durante 30", 52 °C durante 30", 72 °C durante 30".

Tabla 1. Cebadores utilizados para la construcción del casete y para la exploración de clones positivos en el mutante Eck4r1.

Cebador	Secuencia
P1 = pK4_up	5' CAG CAC AGC AGA GCG AAG TGC ARC ATA TCC TTC CAG ATT TAA ATT CTT CAA ATT AAC CCT CAC TAA AGG GCG 3' (SEQIDNO:1)
P2 = FRT_dw:	5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC T3' (SEQIDNO:2)
P3 = pGap_up	5'TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC TC 3' (SEQIDNO:3)
P4 = pGap_dw	5' CGG GAT CCC GAT ATT CCA CCA GCT ATT TGT TAG 3' (SEQIDNO:4)
P5 = rfaH_up	5' CGG GAT CCC GAT GCA ATC CTG GAT TTT ACT GTA C 3' (SEQIDNO:5)
P6 = pk4_dw	5'AAA CTG TGA TCG GGC GTA GGA ACC CGC GTA GTC ATC GTC GGC GCA GAA GTT TAG AGT TTG CGG AAC TCG GTA T 3', (SEQIDNO:6)
Control pK4_up	5' GCC ATT AAG AAA TAC ACG ATT CC 3' (SEQIDNO:7)
Control pK4_dw	5' ATC TTT ATT CTC ATG GCT GAA CG 3' (SEQIDNO:8)

5) Amplificación del gen rfaH (fragmento III) - La amplificación del gen rfaH se lleva a cabo utilizando, como molde, ADN cromosómico de Eck4wt y los cebadores rfaH_up y pK4_dw (Tabla 1). Este último contiene 50 pb que son homólogos a la porción 3' del plásmido PK4 en la que el acontecimiento de recombinación está destinado a ser la diana. El perfil de PCR utilizado fue: 94 °C durante 2'; 25 ciclos: 94 °C durante 1', 56 °C durante 1', 72 °C durante 30"; 72 °C durante 7'.

6) Purificación y digestión de los productos de PCR - Los tres productos obtenidos de las reacciones de PCR se separan en gel de agarosa al 1 %. Después las bandas correspondientes a los pesos moleculares esperados se escinden y purifican siguiendo las instrucciones del kit de extracción en Gel (Quiagen). Los fragmentos resultantes se someten a digestión enzimática durante 3 h a 37 °C, respectivamente con XhoI para los fragmentos I y II y con BamHI para los fragmentos II y III (New England Biolabs) y sus productos se vuelven a purificar. Protocolo de digestión: fragmento I/II/III 1000 ng; enzima BamHI/XhoI 20 U, 1X BSA, tampón 1X, H₂O a un volumen final de 30 µl.

7) Reacciones de ligasa - Todas las reacciones se llevan a cabo estableciendo una relación de 3: 1 entre el fragmento más corto (Lm) y el fragmento más largo (LM), según la siguiente ecuación: $ng\ LM \cdot Kb\ Lm / Kb\ LM \cdot 3/1 = ng\ Lm$. La cantidad de ADN LM utilizada para calcular la cantidad de Lm que se añadirá a la reacción es de 100 ng. A la mezcla de reacción se le añaden 5 U de ADN ligasa de T4 junto con el tampón enzimático específico (concentración final 1X). La reacción se incubó a 16 °C durante 12 h.

Primera reacción de ligasa - La primera reacción de ligasa se realiza con los fragmentos I y II. El producto resultante se somete a electroforesis en gel de agarosa al 1%, se escinde y purifica como se describe anteriormente.

Segunda reacción de ligasa - La segunda reacción de ligasa se realiza con la secuencia obtenida en la primera reacción de ligasa (fragm. I+II) y fragmento III (rfaH), reproduciendo las condiciones anteriores. El casete completo (fragmento I+II+III, de aproximadamente 2.500 pb) se purifica y concentra a 25 ng µl⁻¹.

8) Clonación en el Vector-XL - Todo el casete de integración se inserta en el vector de clonación XL (Invitrogen), que se caracteriza por extremos T que sobresalen. la polimerasa de Taq cataliza la adición de una A extra en el extremo 3' de los transcritos (clonación TA). Siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante, 1 µl de vector se mezcla con 4 µl de producto de PCR y se incuba a temperatura ambiente durante 5 minutos. La muestra se mezcla brevemente y se coloca en hielo.

9) Transformación de E. coli TOP10 por electroporación - Células electrocompetentes Top10 de E. coli (Invitrogen) se transforman por electroporación para permitir la entrada del vector XL-PgaprfaH. Una alícuota de 40 µl de la

suspensión celular se transfiere a cubetas de 0,2 cm a las que se añade la mezcla de inserción del vector. La muestra se incuba en hielo durante aproximadamente 1 minuto y después se coloca en la celda del electroporador (Bio-Rad Gene Pulser), en la que las células reciben una descarga eléctrica (2,5 kV, 200 Ω , 25 μ F). Inmediatamente después de la descarga, se añade 1 ml de medio SOC (composición en g l⁻¹: bacto triptona 20,000, glucosa 3,604, extracto de levadura 0,584, KCl 0,186, MgCl₂ 2,030, MgSO₄ 2,465) y la suspensión celular se transfiere rápidamente a un tubo de polipropileno de 17x100 mm que se incuba con agitación a 37 °C durante 1 h. Para la selección de clones recombinantes, se sembraron en placas alícuotas de diferentes volúmenes en medio selectivo LB (composición en g l⁻¹, triptona 10, NaCl 10, extracto de levadura 5; agar al 1,5 % p/v para la preparación de medio sólido) con kanamicina 50 μ g ml⁻¹ a 37 °C durante 12 h.

10) Exploración de clones recombinantes - Para identificar los clones que contienen el vector con el casete de integración, se realiza una PCR de colonias con colonias desarrolladas después de la transformación. Parte de la colonia se resuspende en 10 μ l de agua estéril y se incuba a 94 °C durante 5 min para obtener la lisis celular y la inactivación de las nucleasas. Después, las muestras se bloquean en hielo. Para la reacción de amplificación se utilizan los cebadores M13 Fw (directo) y M13 Rw (inverso) (Invitrogen).

11) Secuenciación de clones positivos - Los clones positivos seleccionados se someten a extracción de ADN plasmídico (kit QIAprep miniprep de Qiagen) y se secuencian mediante la secuenciación central (310 Applied Biosystems) del Centro Universitario de Pavía (BMR Genomics, Cribi). En las fases posteriores, como moldes, se utilizan vectores que contienen un casete exento de errores. B) Transformación de células Eck4wt.

Células Eck4wt cultivadas en medio LB durante aproximadamente 2 horas (DO de aproximadamente 0,4) se lavan con agua destilada y se resuspenden en 50 μ l de una solución acuosa de glicerol al 10 % v/v. Siguiendo las instrucciones del kit de integración, células electrocompetentes se transformaron con 800 ng de fragmento de ADN lineal que contenía el casete completo. Este último se obtiene utilizando, como molde, L-pGaprfaH y los cebadores pK4_up y rfaH_dw. Al final del procedimiento, se obtienen aislados bacterianos que contienen copias múltiples de la construcción pGapRfaH que carece del marcador de selección. La Tabla 2 muestra la secuencia del casete del promotor pgapP1-rfaH.

Tabla 2 - Secuencia del casete del promotor pgapP1-rfaH (SEQ ID NO: 9).

CAG CAC AGC AGA GCG AAG TGC ARC ATA TCC TTC CAG ATT TAA ATT
 CTT CAA AAT TAA CCC TCA CTA AAG GGC GGC CGC GAA GTT CCT ATT
 CTC TAG AAA GTA TAG GAA CTT CCT CGA GGG CCT TTA AAA TTC GGG
 GCG CCG ACC CCA TGT GGT CTC AAG CCC AAA GGA AGA GTG AGG CGA
 GTC AGT CGC GTA ATG CTT AGG CAC AGG ATT GAT TTG TCG CAA TGA
 TTG ACA CGA TTC CGC TTG ACG CTG CGT AAG GTT TTT GTA ATT TTA CAG
 GCA ACC TTT TAT TCA CTA ACA AAT AGC TGG TGG AAT ATC GGG ATC
 CCG ATG CAA TCC TGG TAT TTA CTG TAC TGC AAG CGC GGG CAA CTT
 CAA CGT GCC CAG GAA CAC CTC GAA AGA CAG GCT GTG AAT TGC CTG
 GCA CCG ATG ATC ACC CTG GAA AAA ATC GTG CGT GGA AAA CGT ACT
 GCA GTC AGT GAG CCA TTG TTT CCC AAC TAC CTG TTT GTC GAA TTT GAT
 CCA GAA GTG ATT CAT ACC ACG ACT ATC AAC GCG ACC CGC GGT GTC
 AGT CAC TTC GTG CGC TTT GGC GCG TCG CCA GCG ATA GTC CCA TCG
 GCG GTG ATT CAT CAG CTA TCG GTA TAT AAA CCG AAA GAC ATT GTC
 GAT CCG GCA ACC CCT TAT CCG GGA GAT AAG GTG ATT ATT ACC GAA
 GGC GCG TTC GAA GGC TTT CAG GCC ATT TTC ACC GAA CCC GAT GGT
 GAG GCT CGC TCC ATG CTA TTG CTT AAT CTT ATT AAT AAA GAG ATT AAG
 CAC AGT GTG AAG AAT ACC GAG TTC CGC AAA CTC TA

Ejemplo 2. Construcción de Eck4r2 recombinante.

La estrategia utilizada para la construcción de Eck4r2 recombinante (*E. coli* K4 recombinante 2) implica la integración, en las copias múltiples (1-5) del plásmido PK4 endógeno de Eck4wt, de un casete de expresión que

5 contiene el gen *rfaH* bajo el control de pGapP1-P4 (sistema de cuatro promotores P1-P2-P3-P4 del gen que codifica la gliceraldehído-3-P deshidrogenasa, GAPDH) para obtener la transcripción constante del gen *rfaH* a lo largo de la fase de crecimiento. El procedimiento se realiza como se describe en el Ejemplo 1, excepto que, en este caso, la construcción del casete que se integrará en PK4 implica la amplificación del promotor pGapP1-P4 completo del genoma *Eck4wt*. El sitio de integración identificado en PK4 es el mismo que en el ejemplo 1. Por lo tanto, la operativa de adaptación del casete de integración es como se describe en el Ejemplo 1, utilizando los cebadores mostrados en la Tabla 3 para experimentos de amplificación.

Tabla 3 - Cebadores utilizados para la construcción de casetes y para la exploración de clones positivos en el mutante *Eck4r3*.

Cebador	Secuencia
P1 = PK4_up	Como en el ejemplo 1, Tabla 2
P2 = FRT_dw:	Como en el ejemplo 1, Tabla 2
P3 = pGaptutto_up	5'GCC TCG AGG CGA TCA AAC AGT GAT ATA CGC 3' (SEQIDNO:10)
P4 = pGapnew_dw	Como en el ejemplo 1, Tabla 2
P5 = <i>rfaH</i> _up	Como en el ejemplo 1, Tabla 2
P6 = PK4_dw	Como en el ejemplo 1, Tabla 2

10 **EJEMPLO 3. Construcción de *Eck4r3* recombinante.**

La estrategia utilizada para la construcción de *Eck4r3* recombinante (*E. coli* K4 recombinante 3) implica la integración en el genoma *Eck4wt* de un casete de expresión que contiene el gen *rfaH* bajo pGapP1 para obtener la transcripción constante del gen *rfaH* a lo largo de la fase de crecimiento.

A) Construcción del casete de inserción

- 15 1) Extracción de ADN genómico de *Eck4wt* - La operativa es como se describe en el Ejemplo 1.
 2) Adaptación del casete de integración - La operativa es como se describe en el Ejemplo 1, utilizando los cebadores presentados en la Tabla 4 para experimentos de amplificación.
 20 3) Amplificación del casete funcional (fragmento I) - El casete proporcionado en el kit se amplifica utilizando el par de cebadores LacZ_up y FRT_dw (Tabla 1). El oligo LacZ_up contiene la región de 100 pb similar a la porción 5' del gen LacZ en la que el acontecimiento de recombinación está destinado a ser la diana. El perfil de PCR utilizado fue: 94 °C durante 2'; 25 ciclos: 94°C durante 1', 56°C durante 1', 72°C durante 2'; 72 °C durante 7'.
 4) Amplificación del promotor Pgap (P1) (fragmento II) - El procedimiento es como en el Ejemplo 1.
 25 5) Amplificación del gen *rfaH* (fragmento III) - La amplificación del gen *rfaH* se lleva a cabo utilizando, como molde, ADN cromosómico de *Eck4wt* y los cebadores *rfaH*_up y LacZ_dw. Este último contiene 100 pb que son homólogos a la porción 3' del segmento localizado corriente abajo del gen LacZ en el genoma *Eck4wt*, en la que el acontecimiento de recombinación está destinado a ser la diana. El perfil de PCR utilizado fue: 94 °C durante 2'; 25 ciclos: 94 °C durante 1', 56 °C durante 1', 72 °C durante 30"; 72 °C durante 7'.

Tabla 4. Cebadores utilizados para la construcción de casetes y para la exploración de clones positivos en el mutante *Eck4r3*.

Cebador	Secuencia
P1 = LacZ_up	5' CAC CCT GGC GCC CAA TAC GCA AAC CGC CTC TCC CCG CGC GTT GGC CGA TTC ATT AAT GCA GCT GGC ACG ACA GGT TTC CCG ACT GGA AAG CGG GCA GTG AAA TTA ACC CTC ACT AAA GGG CGG 3' (SEQIDNO:11)

(continuación)

Cebador	Secuencia
P2 = FRT_dw:	Como en el ejemplo 1, Tabla 2
P3 = pGap_up	Como en el ejemplo 1, Tabla 2
P4 = pGap_dw	Como en el ejemplo 1, Tabla 2
P5 = rfaH_up	Como en el ejemplo 1, Tabla 2
P6 = LacZ_dw	5'AAA AGA ATA AAC CGA ACA TCC AAA AGT TTG TGT TTT TTA AAT AGT ACA TAA TGG ATT TCC TTA CGC GAA ATA CGG GCA GAC ATG GCC TGC CCG GTT ATT TAG AGT TTG CGG AAC TCG GTA TTC 3' (SEQIDNO:12)

- 6) Purificación y digestión de productos de PCR - El procedimiento es como en el Ejemplo 1.
 7) Reacciones de ligasa - El procedimiento es como en el Ejemplo 1.
 8) Clonación en el vector XL - El procedimiento es como en el Ejemplo 1.
 5 9) Transformación de *E. coli* TOP10 por electroporación - El procedimiento es como en el Ejemplo 1.
 10) Exploración de clones recombinantes - El procedimiento es como en el Ejemplo 1.
 11) Secuenciación de clones positivos - El procedimiento es como en el Ejemplo 1.
 B) Transformación de células Eck4wt.
- 10 El procedimiento es como en el Ejemplo 1, con la única diferencia de que el casete completo contenido en el fragmento de ADN lineal se obtiene utilizando, como molde, XL-pGaprfaH y los cebadores LacZ_Up y LacZ_Dw. La Tabla 5 muestra la secuencia del casete del promotor pgapP1-rfaH.

Tabla 5. Secuencia del casete del promotor pgapP1-rfaH (SEQ ID NO: 13).

CAC CCT GGC GCC CAA TAC GCA AAC CGC CTC TCC CCG CGC GTT GGC
 CGA TTC ATT AAT GCA GCT GGC ACG ACA GGT TTC CCG ACT GGA AAG
 CGG GCA GTG AAA TTA ACC CTC ACT AAA GGG CGG CCG CGA AGT TCC
 TAT TCT CTA GAA AGT ATA GGA ACT TCC TCG AGG GCC TTT AAA ATT CGG
 GGC GCC GAC CCC ATG TGG TCT CAA GCC CAA AGG AAG AGT GAG GCG
 AGT CAG TCG CGT AAT GCT TAG GCA CAG GAT TGA TTT GTC GCA ATG
 ATT GAC ACG ATT CCG CTT GAC GCT GCG TAA GGT TTT TGT AAT TTT ACA
 GGC AAC CTT TTA TTC ACT AAC AAA TAG CTG GTG GAA TAT CGG GAT
 CCC GAT GCA ATC CTG GTA TTT ACT GTA CTG CAA GCG CGG GCA ACT
 TCA ACG TGC CCA GGA ACA CCT CGA AAG ACA GGC TGT GAA TTG CCT
 GGC ACC GAT GAT CAC CCT GGA AAA AAT CGT GCG TGG AAA ACG TAC
 TGC AGT CAG TGA GCC ATT GTT TCC CAA CTA CCT GTT TGT CGA ATT TGA
 TCC AGA AGT GAT TCA TAC CAC GAC TAT CAA CGC GAC CCG CGG TGT
 CAG TCA CTT CGT GCG CTT TGG CGC GTC GCC AGC GAT AGT CCC ATC
 GGC GGT GAT TCA TCA GCT ATC GGT ATA TAA ACC GAA AGA CAT TGT
 CGA TCC GGC AAC CCC TTA TCC GGG AGA TAA GGT GAT TAT TAC CGA
 AGG CGC GTT CGA AGG CTT TCA GGC CAT TTT CAC CGA ACC CGA TGG
 TGA GGC TCG CTC CAT GCT ATT GCT TAA TCT TAT TAA TAA AGA GAT TAA
 GCA CAG TGT GAA GAA TAC CGA GTT CCG CAA ACT CTA TAA TAA CCG
 GGC AGG CCA TGT CTG CCC GTA TTT CGC GTA AGG AAA TCC ATT ATG
 TAC TAT TTA AAA AAC ACA AAC TTT TGG ATG TTC GGT TTA TTC TTT T

EJEMPLO 4. Construcción de Eck4r4 recombinante

- 5 La estrategia utilizada para la construcción de Eck4r4 recombinante (*E. coli* 4 recombinante K4) implica la modificación por ingeniería genética de Eck4wt utilizando mutagénesis insercional basada en el uso de elementos transponibles. Para esta finalidad, se aprovecharon las características del grupo de genes de *E. coli*, concretamente, la presencia de la secuencia de inserción IS2 y la prueba experimental de que la sobreexpresión de rfaH puede influir en la producción del polisacárido K4.

Tabla 6 - Cebador para la construcción del casete IS2-rfaH.

Cebador	Secuencia
rfaHIS2_Up	5'- CGG GAT CCG AAT GCA ATC CTG GTA TTT ACT G -3' (SEQIDNO:14)
rfaHIS2_Dw	5' - CGG AGC TCT TAG AGT TTG CGG AAC TCG GT - 3' (SEQIDNO:15)
RIR	5' - TGG ATT TGC CCC TAT GTT TCC AGA TAC CTG TTA TCA CTT AAA GCT - 3' (SEQIDNO:16)
ANTIRIR	5' - TTA AGT GAT AAC AGG TAT CTG GAA ACA TAG GGG CAA ATC CA - 3' (SEQIDNO:17)

(continuación)

Cebador	Secuencia
IRL_Up	5'-TAG ACT GGC CCC CTG AAT CTC C-3' (SEQIDNO:18)
IRL_Dw	5'- CGG GAT CCT CCA ATG ACT AGT CTA AAA ACT AG-3' (SEQIDNO:19)

En general, la secuencia IS2 contiene un promotor seguido por un gen que codifica una transposasa, estos genes tienen secuencias flanqueantes denominadas IRL (NIR) y RIR. La estrategia se basa en la construcción de un elemento IS2 modificado que contiene el gen *rfaH* en lugar del gen que codifica la transposasa. IRL, RIR y *rfaH* se amplificaron a partir de ADN genómico de *E.coli* K4, utilizando los cebadores presentados en la Tabla 6, y posteriormente digeridos con enzimas de restricción apropiadas para crear fragmentos con extremos compatibles y listos para someterse a una reacción de ligamiento. El fragmento resultante (IRL-*rfaH*-RIR) se amplificó y se insertó en el vector de clonación XL (Invitrogen) que se utilizó posteriormente para transformar células de *E. coli* K4. Se produjo un acontecimiento/acontecimientos de integración aleatoria independientemente (después de los ciclos de evolución para la expulsión del vector y del establecimiento de un mutante estable, por ejemplo, 3 ciclos de crecimiento consecutivos en un matraz durante 24 h) produciendo un mutante con al menos una copia del gen *rfaH* sobreproduciendo el polisacárido K4.

Tabla 7 - secuencia de IS2-*rfaH* (SEQ ID NO:20)

TAG ACT GGC CCC CTG AAT CTC CAG ACA ACC AAT ATC ACT TAA ATA
 AGT GAT AGT CTT AAT ACT AGT TTT TAG ACT AGT CAT TGG AGG ATC
 CGA ATG CAA TCC TGG TAT TTA CTG TAC TGC AAG CGC GGG CAA CTT
 CAA CGT GCC CAG GAA CAC CTC GAA AGA CAG GCT GTG AAT TGC CTG
 GCA CCG ATG ATC ACC CTG GAA AAA ATC GTG CGT GGA AAA CGT ACT
 GCA GTC AGT GAG CCA TTG TTT CCC AAC TAC CTG TTT GTC GAA TTT
 GAT CCA GAA GTG ATT CAT ACC ACG ACT ATC AAC GCG ACC CGC GGT
 GTC AGT CAC TTC GTG CGC TTT GGC GCG TCG CCA GCG ATA GTC CCA
 TCG GCG GTG ATT CAT CAG CTA TCG GTA TAT AAA CCG AAA GAC ATT
 GTC GAT CCG GCA ACC CCT TAT CCG GGA GAT AAG GTG ATT ATT ACC
 GAA GGC GCG TTC GAA GGC TTT CAG GCC ATT TTC ACC GAA CCC GAT
 GGT GAG GCT CGC TCC ATG CTA TTG CTT AAT CTT ATT AAT AAA GAG
 ATT AAG CAC AGT GTG AAG AAT ACC GAG TTC CGC AAA CTC TAA GAG
 CTC TTA AGT GAT AAC AGG TAT CTG GAA ACA TAG GGG CAA ATC CA.

15 **Ejemplo 5. Producción en matraz del polisacárido capsular K4 utilizando los mutantes EcK4r1, EcK4r2 y EcK4r3 y la cepa EcK4wt de tipo silvestre.**

Para evaluar comparativamente la eficacia de producción del polisacárido capsular K4, las cepas mutantes EcK4r1, EcK4r2 y EcK4r3 y la cepa EcK4wt de tipo silvestre, se cultivaron en un matraz, variando las fuentes de nutrientes: medio 1, glicerol 10 g l⁻¹ + soja 1 g l⁻¹; medio 2, glicerol 10 g l⁻¹ + casaminoácidos 2 g l⁻¹; medio 3, glucosa 10 g l⁻¹ + extracto de levadura 1 g l⁻¹; medio 4, glucosa 10 g l⁻¹ + extracto de levadura 2 g l⁻¹. Todos los medios tenían un pH de 7,5 y contenían la misma solución salina: K₂HPO₄ 10 g l⁻¹; KH₂PO₄ 2 g l⁻¹; MgCl₂ 0,1 g l⁻¹; citrato de sodio 0,5 g l⁻¹ (NH₄)₂SO₄ 1 g l⁻¹.

Los matraces se incuban en un agitador orbital que funciona a 200 rpm. A un valor de absorbancia de aproximadamente 5,0 DO₆₀₀ (12-16 horas de incubación), las cepas recombinantes tienen una producción promedio de polisacárido capsular K4 que es de 1,8 a 3,0 veces mayor que la de la cepa de tipo silvestre (Tabla 8). La estabilidad genética de los recombinantes se evalúa mediante sucesivos ciclos de crecimiento llevados a cabo en un matraz, que confirman que se mantienen los niveles de productividad observados. Los análisis de PCR realizados después de cada ciclo de crecimiento muestran que las construcciones todavía están presentes en el material genético de los recombinantes después de 10 días de cultivo.

Tabla 8. Producción de polisacárido capsular K4 en matraz utilizando diferentes medios de cultivo.

Medio	1	2	3	4
cepa	polisacárido K4 (mg l ⁻¹)			
EcK4wt	95±10	80±10	90±10	100±15
EcK4r1	170±18	150±20	165±15	180±18
EcK4r2	280±20	250±20	270±25	300±25
EcK4r3	210±20	190±15	200±15	230±20
EcK4r4	190±20	180±15	200±15	210±30

Ejemplo 6. Producción de polisacárido capsular K4 por fermentación discontinua, utilizando los mutantes EcK4r1, EcK4r2 y EcK4r3 y la cepa EcK4wt de tipo silvestre.

5 El crecimiento de las cepas mutantes EcK4r1, EcK4r2 y EcK4r3 y de la cepa EcK4wt de tipo silvestre se lleva a cabo en un biorreactor de 2,5 l (Biostat C Plus de B. Biotech International, Melsungen, Alemania) equipado con una unidad de control digital (UCD) para la medición continua de los parámetros de fermentación (pH, pO₂, velocidad de agitación, ventilación, temperatura). El crecimiento se lleva a cabo usando los medios de cultivo 1 y 4 presentados en la Tabla 8 del Ejemplo 5. El registro y el control de los parámetros de fermentación se gestionan a través del programa de adquisición de datos del Sistema de control de múltiples fermentadores para Windows NT (programa informático MFCS/win B. Braun Biotech International). Como inóculo se utiliza un volumen variable del cultivo del matraz, que se calcula para dar una DO₆₀₀ inicial entre 0,08 y 0,10. Las condiciones de fermentación utilizadas fueron: temperatura a 37 °C; pH 7,5 controlado por adición de NH₄OH (50 % v/v) o H₂SO₄ (30 % v/v); concentración inicial de glicerol 10 g·l⁻¹; valor de agitación inicial 500 rpm; valor de flujo de aire inicial 2-3 l min⁻¹ (la agitación y la ventilación se ajustan automáticamente durante la fermentación para garantizar que la pO₂ sea superior al 20 % en cualquier momento). El ciclo de crecimiento se controla midiendo la absorbancia a 600 nm, la cinética del consumo de glicerol, la formación de ácidos orgánicos y la producción de polisacárido capsular K4. El crecimiento generalmente se interrumpe al comienzo de la fase de crecimiento estacionario después de 20-24 horas desde el inicio de la fermentación. Como se presenta en la Tabla 9, la productividad de las cepas recombinantes en el mejor medio es de 1,3 a 1,8 veces más alta que la de la cepa de tipo silvestre.

20 Tabla 9. Producción de polisacárido capsular K4 por fermentación discontinua en diferentes medios de cultivo.

Medio	1	4
cepa	polisacárido K4 (mg l ⁻¹)	
EcK4wt	300±20	310±25
EcK4r1	420±30	470±40
EcK4r2	450±25	490±35
EcK4r3	475±35	525±25
EcK4r4	445±25	480±25

Ejemplo 7. Producción de polisacárido capsular K4 por fermentación semidiscontinua, utilizando los mutantes EcK4r1, EcK4r2 y EcK4r3 y la cepa EcK4wt de tipo silvestre.

25 El procedimiento es como se describe en el Ejemplo 5 para fermentaciones discontinuas, utilizando los mismos medios de cultivo, excepto que después de 5-7 horas, cuando aumentan los valores de pO₂ y el pH, la fase de alimentación se inicia y lleva a cabo durante un promedio de 25 horas. La adición de nutrientes se mantiene por debajo de la tasa de absorción del sustrato para impedir que se produzca el fenómeno de *desbordamiento* del metabolismo. Esto se logra de una manera metabólicamente controlada ajustando la adición de nutrientes según la pO₂ del medio, que debe mantenerse a aproximadamente 30 %. De hecho, la TOD (Tensión de Oxígeno Disuelto) aumenta rápidamente cuando se consume todo el sustrato en el fermentador, pero la adición de la fuente de carbono al reactor produce una disminución de la TOD. En la práctica, la adición controlada de una solución concentrada de nutrientes se realiza mediante un controlador PID conectado a una bomba de alimentación que suministra los nutrientes. Cuando la falta de nutrientes produce un aumento de la TOD, la alimentación se activa automáticamente hasta alcanzar el punto de ajuste de pO₂. En este punto, la bomba de alimentación se bloquea hasta que se consume la fuente de carbono, produciendo un nuevo aumento repentino del valor de pO₂ y desencadenando una nueva ronda de alimentación. Las soluciones de nutrientes concentradas utilizadas son: medio 1 glicerol 400 g·l⁻¹ + harina de soja 40 g·l⁻¹ p/v; medio 2 glucosa 400 g·l⁻¹ + extracto de levadura 80 g·l⁻¹. Al final del

procedimiento las cepas recombinantes utilizan: Para el medio 1, aproximadamente 60 g·l⁻¹ de glicerol y 5,8 g·l⁻¹ de soja con una producción de polisacárido capsular K4 que es 1,4-1,8 veces mayor que la del tipo silvestre (Tabla 10) pero consume 38 % más nutrientes; para el medio 4, 68 g·l⁻¹ de glucosa y 13,6 g·l⁻¹ de EL, con una producción de polisacárido capsular K4 que es 1,5-1,9 veces mayor que la del tipo silvestre (Tabla 9) pero consume 40 % más nutrientes.

Tabla 10. Producción de polisacárido capsular K4 por fermentación - semidiscontinua en diferentes medios de cultivo.

Medio	1	4
cepa	polisacárido K4 (mg l ⁻¹)	
EcK4wt	1,400±150	1500±200
EcK4r1	2,000±100	2,350±150
EcK4r2	2,150±130	2,500±230
EcK4r3	4,000±100	5,100±250
EcK4r3	3,000±100	3,500±250

Ejemplo 8. Producción de polisacárido capsular K4 por fermentación en régimen de microfiltración, utilizando los mutantes EcK4r1, EcK4r2 y EcK4r3 y la cepa EcK4wt de tipo silvestre.

El procedimiento es como se describe en el Ejemplo 6 para fermentaciones, utilizando los mismos medios de cultivo excepto que, después de una fase discontinua inicial (7 h) y de una fase semidiscontinua posterior (5 h), se activan los módulos de microfiltración para reemplazar el medio empobrecido. La fase de microfiltración dura un promedio de 35 h. En este caso, el procedimiento de microfiltración se lleva a cabo utilizando un módulo de fibra hueca fabricado de poliétersulfona con un límite de 0,22 µm y un área comprendida entre 0,02 y 0,1 m². Los ejemplos de intervalos operativos de los parámetros del procedimiento de MF son: Capacidad de recirculación de flujo tangencial 6-10 l min⁻¹; presión transmembrana 0,8-1,2 atm; temperatura ambiente. El intercambio de 1 volumen de cultivo en aproximadamente 2-4 h se obtuvo en estas condiciones.

En las fases de alimentación y microfiltración, la tasa de adición de nutrientes se controla para mantener la pO₂ del medio de cultivo en aproximadamente 30 %, utilizando un controlador PID conectado a la bomba de alimentación que suministra los nutrientes. Cuando la falta de nutrientes produce un aumento de la TOD, la alimentación se activa automáticamente hasta alcanzar el punto de ajuste de pO₂. En este punto, la bomba de alimentación se estabiliza a un valor mínimo de rondas/minuto para garantizar, a diferencia de los experimentos semidiscontinuos, el mantenimiento de una concentración mínima de carbono en el recipiente de fermentación, a pesar del suministro continuo de medio. El empobrecimiento de la fuente de carbono determina de nuevo un aumento repentino del valor de pO₂, desencadenando una nueva ronda de alimentación a una velocidad de rotación de la bomba peristáltica que es más alta que el mínimo establecido por defecto. Durante la microfiltración, el volumen del cultivo bacteriano se mantiene constante mediante un circuito de control especial (controlador de nivel) mediante la adición de una solución de sales minerales que es idéntica a la utilizada en el medio de crecimiento. Utilizando la misma solución salina, cada hora se realiza un retrolavado para disminuir los efectos de ensuciamiento durante la microfiltración.

Durante los experimentos, la agitación y la ventilación variaron de 250 a 1.000 rpm y de 1 a 1,6 l min⁻¹, respectivamente, para mantener el porcentaje de oxígeno disuelto cerca del 20 % de saturación.

Al final del procedimiento, las cepas recombinantes utilizan: para el medio 1, aproximadamente 130 g l⁻¹ de glicerol y 13 g l⁻¹ de soja con una producción de polisacárido capsular K4 que es 2,2-2,6 veces mayor que la del tipo silvestre (Tabla 10) pero consume 30 % más nutrientes; para el medio 4, aproximadamente 90-100 g·l⁻¹ de glucosa y 18-20 g·l⁻¹ de EL, con una producción de polisacárido capsular K4 que es 2,3-2,7 veces mayor que la del tipo silvestre (Tabla 11) pero consume 25% más nutrientes. En ambos casos, el volumen de microfiltrado es de aproximadamente 10-12 l y la cantidad de polisacárido capsular K4 que se encuentra en el microfiltrado es del 25-30 % del producto total.

Tabla 11. Producción de polisacárido capsular K4 por fermentación en régimen de microfiltración en diferentes medios de cultivo.

Medio	1	4
cepa	polisacárido K4 (mg l ⁻¹)	
EcK4wt	3,500±100	3,750±150

(continuación)

Medio	1	4
cepa	polisacárido K4 (mg l ⁻¹)	
EcK4r1	7,800±185	8,600±160
EcK4r2	8,200±150	8,900±180
EcK4r3	8,400±190	9,200±150

Ejemplo 9. Producción de polisacárido capsular K4 a una escala de 1m³.

La cepa recombinante EcK4r3 se emplea utilizando el medio de cultivo 1 del Ejemplo 4. El producto de fermentación (40-60 l) obtenido a partir de un procedimiento discontinuo como se describe en el Ejemplo 5, y utilizando un fermentador de 75 l, se utiliza como inóculo. El inóculo se incuba en el fermentador durante 6-8 h hasta que se alcanza una densidad celular de 5 ± 1 DO₆₀₀. La escala de producción de m³ emplea un fermentador de 1,2 m³ que contiene 1 m³ de medio de cultivo. La fermentación se lleva a cabo mediante la misma estrategia descrita en el Ejemplo 7, excepto que se utiliza una unidad de microfiltración externa que consiste en un módulo de fibra hueca con un área de filtro de 8-10 m² que funciona con un flujo tangencial de 10 l min⁻¹. La duración de las fases discontinua y semidiscontinua es de 5-7 h y 4-6 h, respectivamente. En la fase semidiscontinua, se añaden 40 l de solución concentrada de nutrientes en general, para un total de 12,5 kg de glucosa y 2,5 kg de extracto de levadura. La fase en el régimen de microfiltración dura 24-36 h y el volumen del microfiltrado es de 6-7 m³.

En general, se obtienen 9 Kg de polisacárido capsular K4, 30 % de los cuales se encuentra en el microfiltrado.

Ejemplo 10. Obtención de condroitina mediante el procedimiento 1.

El ejemplo describe el procesamiento corriente abajo de un caldo de fermentación obtenido como se describe en el Ejemplo 9. Al final de la fermentación, el componente celular se elimina del caldo de cultivo (1.000 l) mediante centrifugación continua utilizando una centrífuga alfa-laval (Clara80) que funciona a 6.000 rpm a 15-25 °C. El microfiltrado de la última fase de fermentación (7.000 l) se añade al sobrenadante transparente, seguido de la adición de una proteasa (flavourzyme) de *Aspergillus oryzae* (10 µl l⁻¹, 500 U g⁻¹, 2-5 U l⁻¹ final) e incubación con agitación durante 2 h a temperatura ambiente o a 4 °C durante 12-16 h para hidrolizar las proteínas. La solución se ultrafiltra posteriormente en un sistema de micro/ultra/diafiltración tangencial Millipore montado en un bastidor especial con una capacidad de depósito de 1 m³, equipado con módulos de fibra hueca o casetes (límite de 100 kDa, área de filtro de 40 m²). Cuando el volumen se reduce a 90-100 l, la diafiltración se lleva a cabo con agua ultrapura (AUP) a un volumen constante, hasta que se obtiene una conductividad residual por debajo de 500 µS/cm (5 volúmenes). después, se añade ácido acético al 1 % v/v y la solución se calienta a 100 °C durante 1,25 h. La desfructosilación del polisacárido capsular K4 y la hidrólisis de LPS se obtienen simultáneamente en estas condiciones, separando así el componente oligosacárido (cadena o) del componente lipídico (lípidos A) que precipita. La suspensión se clarifica por centrifugación continua a 6.000 rpm (1 h) o por sedimentación a 4 °C (16-18 h). La solución transparente (70-80 l), ajustada a pH 7 por adición de NaOH y complementada con NaCl a una concentración de 0,2 M, se somete a ultrafiltración-diafiltración utilizando el mismo aparato Millipore equipado con módulos de casetes/fibra hueca (10 m²) fabricados de poliétersulfona o polipropileno con un límite de 30-100 KDa. La solución se concentra inicialmente (2-5x) y después se diafiltra hasta que la conductividad sea inferior a 80-100 µS/cm⁻¹. Después, la solución se deshidrata mediante liofilización. El rendimiento total del procedimiento de purificación es del 75 %. se obtienen 4.790 g de sal sódica de condroitina con las siguientes especificaciones: polvo blanco, 12 % de contenido de H₂O residual, pureza >95%, PM 38±2 kDa.

Ejemplo 11. Obtención de condroitina mediante el procedimiento 2.

El ejemplo describe el procesamiento corriente abajo de un caldo de fermentación obtenido como se describe en el Ejemplo 8. Al final de la fermentación, el componente celular se elimina del caldo de cultivo (1.000 l) mediante centrifugación continua utilizando una centrífuga alfa-laval (Clara80) que funciona a 6.000 rpm a 15-25 °C. El microfiltrado de la última fase de fermentación (7.000 l) se añade al sobrenadante transparente, seguido de la adición de ácido acético al 4 % v/v hasta un pH entre 2,8 y 3,0, calentando la solución a 100 °C durante 1 h. Estas condiciones producen la desfructosilación del polisacárido capsular K4 y la división del lípidos A de LPS que precipita como un sólido céreo. Este último se separa por sedimentación a 4 °C (10-16 h), seguido de centrifugación continua a 6.000 rpm (aprox. 2 horas) o de sedimentación. La solución transparente (aproximadamente 7,500 l), ajustada a pH 7 por adición de NaOH y complementada con NaCl a una concentración de 0,1 M, se somete a ultrafiltración-diafiltración utilizando el aparato descrito anteriormente equipado con módulos de casetes/fibra hueca (10 m²) fabricados de poliétersulfona o polipropileno con un límite de 50 KDa. La solución se concentra (40x) y después se diafiltra hasta que la conductividad sea inferior a 80-100 µS/cm⁻¹. La solución, aproximadamente 200 l, se complementa con NaCl a una concentración final de 0,1 M y después con 2 volúmenes de etanol al 95 % para la precipitación de condroitina sódica. El precipitado húmedo recogido después de la sedimentación (aproximadamente

6.500 g) se lava después con etanol anhidro (15 l) y se deshidrata al vacío a 30 °C. El rendimiento total del procedimiento de purificación es del 85 %. se obtienen 5.430g de sal sódica de condroitina con las siguientes especificaciones: polvo blanco, 12 % de contenido de H₂O residual, pureza >94%, PM 35±2 kDa.

Ejemplo 12. Obtención de condroitina mediante el procedimiento 3.

5 El ejemplo describe el procesamiento corriente abajo de un caldo de fermentación obtenido como se describe en el Ejemplo 8, utilizando solo procedimientos de membrana. Al final de la fermentación, el componente celular se elimina del caldo de cultivo presente en el fermentador (1.000 l) ampliando la fase de microfiltración sin la adición de solución salina. Después de concentrar el caldo a 300 l, se añade un volumen de agua ultrapura y para aumentar la recuperación del polisacárido capsular, se realiza nuevamente la concentración por microfiltración a 300 l; repitiéndose esta etapa de lavado al menos 2 veces. Después de la adición del microfiltrado obtenido durante la fermentación (6.000 l), el caldo de fermentación sin células (aproximadamente 1.200 l) se trata como se describe en el Ejemplo 9, primero con proteasa, después por hidrólisis con ácido acético y finalmente se ultrafiltra-diafiltra. El concentrado así obtenido se deshidrata mediante un secador por pulverización. El rendimiento total del procedimiento de purificación es del 90 %. se obtienen 5.750g de sal sódica de condroitina con las siguientes especificaciones: polvo blanco, 10% de contenido de H₂O residual, pureza >93%, PM 38±2 kDa.

Ejemplo 13. Obtención de condroitina mediante el procedimiento 4.

El ejemplo describe el procesamiento corriente abajo de un caldo de fermentación obtenido como se describe en el Ejemplo 8. Al final de la fermentación, el caldo de cultivo (1.000 l) se complementa con ácido tricloroacético (TCA 50 % v/v) al 5 % del volumen, hasta pH <4. Después, este caldo se filtra en tierra de diatomeas o celite con la ayuda de un filtro de placa de tipo FUNDA. El caldo clarificado se microfiltra con la ayuda de un dispositivo capsular asimétrico (0,2-0,6 μm); GE) en modo punto muerto y se neutraliza mediante la adición de NaOH. A este material se le añaden aproximadamente 7.000 l de microfiltrado, y el caldo clarificado se concentra posteriormente mediante ultrafiltración y diafiltración; cuando el volumen se reduce a 200 l, se realiza la diafiltración con agua ultrapura (AUP) a un volumen constante hasta que se obtiene una conductividad residual por debajo de 500 μSicm⁻¹ (5 volúmenes). después, se añade ácido acético al 1 % v/v y la solución se calienta a 100 °C durante 1,25 h. Después de la centrifugación, el pH del sobrenadante transparente (160 l) ajustado a 7 mediante la adición de NaOH y complementado con NaCl hasta una concentración de 0,2 M, se sometió a ultrafiltración-diafiltración utilizando el mismo aparato Millipore equipado con módulos de casetes/fibra hueca (10 m²) fabricados de poliétersulfona o polipropileno con un límite de 50 KDa. La solución se concentra inicialmente (3x) y después se diafiltra hasta que la conductividad sea inferior a 100 μSicm⁻¹. Posteriormente, la solución llevada a 0,125 M de NaCl se complementa con 2 volúmenes de acetona para precipitar la condroitina. El precipitado, recogido en filtros o sedimentado, se seca en un horno a 40 °C. El rendimiento total del procedimiento de purificación es del 70 %. Se obtienen 4.480g de condroitina con las siguientes especificaciones: polvo blanco, 12 % de contenido de H₂O residual, pureza >92 %, PM 35±2 kDa.

35 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> ALTERGON S.A.

<120> Producción biotecnológica de condroitina

<130> 9724PTWO

<150> MI2009A000923

40 <151> 25-05-2009

<160> 20

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 72

45 <212> ADN

<213> *Escherichia coli*

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(72)

50 <400> 1

cagcacagca gagcgaagtg carcatatcc ttccagattt aaattcttca aattaaccct 60

cactaaaggg cg 72

ES 2 676 755 T3

<210> 2
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli*
 5 <220>
 <221> primer_bind
 <222> (1)..(22)
 <400> 2
 taatacgact cactataggg ct 22
 10 <210> 3
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli*
 15 <220>
 <221> primer_bind
 <222> (1)..(23)
 <400> 3
 taatacgact cactataggg ctc 23
 20 <210> 4
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli*
 25 <220>
 <221> primer_bind
 <222> (1)..(33)
 <400> 4
 cgggatcccg atattccacc agctattgt tag 33
 30 <210> 5
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli*
 35 <220>
 <221> primer_bind
 <222> (1)..(34)
 <400> 5
 cgggatcccg atgcaatcct ggattttact gtac 34
 40 <210> 6
 <211> 73
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli*
 <220>
 <221> primer_bind
 <222> (1)..(73)
 <400> 6
 aaactgtgat cgggcgtagg aaccgcgta gtcacgctcg gcgcagaagt ttagagtttg 60
 45 cggaactcgg tat 73
 <210> 7
 <211> 23

ES 2 676 755 T3

<212> ADN
 <213> *Escherichia coli*

 <220>
 <221> primer_bind
 <222> (1)..(23)
 <400> 7

 gccattaaga aatacacgat tcc 23

 <210> 8
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli*

 <220>
 <221> primer_bind
 <222> (1)..(23)
 <400> 8

 atctttatc tcatggctga acg 23

 <210> 9
 <211> 809
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli*

 <220>
 <221> primer_bind
 <222> (1)..(809)
 <400> 9

 cagcacagca gagcgaagtg carcatatcc ttccagattt aaattcttca aaattaacct 60
 tcactaaagg gcggccgcga agttcctatt ctctagaaag tataggaact tcctcgaggg 120
 cctttaaaat tcggggcgcc gaccccatgt ggtctcaagc ccaaaggaag agtgaggcga 180
 gtcagtcgcg taatgcttag gcacaggatt gatctgtcgc aatgattgac acgattccgc 240
 ttgacgctgc gtaaggTTTT tgtaatttta caggcaacct tttattcact aacaaatagc 300
 tgggtggaata tcgggatccc gatgcaatcc tggatattac tgtactgcaa gcgcgggcaa 360
 cttcaacgtg cccaggaaca cctcgaaaga caggctgtga attgcctggc accgatgatc 420
 accctgaaa aaatcgtgcg tggaaaacgt actgcagtca gtgagccatt gtttcccaac 480
 tacctgtttg tcgaatttga tccagaagtg attcatacca cgactatcaa cgcgaccgcg 540
 ggtgtcagtc acttcgtgcg ctttggcgcg tcgccagcga tagtcccatc ggcggtgatt 600
 catcagctat cggtatataa accgaaagac attgtcgatc cggcaacccc ttatccggga 660
 gataaggTga ttattaccga aggcgcgTtc gaaggctttc aggcattttt caccgaacct 720
 gatggTgagg ctcgctccat gctattgctt aatcttatta ataaagagat taagcacagt 780
 gtgaagaata ccgagttccg caaactcta 809

 <210> 10
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli*

ES 2 676 755 T3

<220>
 <221> primer_bind
 <222> (1)..(30)
 <400> 10
 5 gcctcgaggc gatcaaacag tgatatacgc 30

 <210> 11
 <211> 123
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli*
 10 <220>
 <221> primer_bind
 <222> (1)..(123)
 <400> 11
 caccctggcg cccaatacgc aaaccgcctc tccccgcgcg ttggccgatt cattaatgca 60
 gctggcacga caggtttccc gactggaaag cgggcagtga aattaaccct cactaaaggg 120
 cgg 123
 15 <210> 12
 <211> 123
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli*
 20 <220>
 <221> primer_bind
 <222> (1)..(123)
 <400> 12
 aaaagaataa accgaacatc caaaagtttg tgtttttttaa atagtacata atggatttcc 60
 ttacgcgaaa tacgggcaga catggcctgc ccggttattt agagtttgcg gaactcggta 120
 ttc 123
 25 <210> 13
 <211> 958
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli*
 30 <220>
 <221> primer_bind
 <222> (1)..(958)
 <400> 13

ES 2 676 755 T3

caccctggcg cccaatacgc aaaccgcctc tccccgcgcg ttggccgatt cattaatgca 60
gctggcacga caggtttccc gactggaaag cgggcagtga aattaaccct cactaaaggg 120
cggccgcgaa gttcctattc tctagaaagt ataggaactt cctcgagggc ctttaaaatt 180
cggggcgcgg accccatgtg gtctcaagcc caaaggaaga gtgaggcgag tcagtcgctg 240
aatgcttagg cacaggattg atttgtcgca atgattgaca cgattccgct tgacgctgctg 300
taaggttttt gtaattttac aggcaacctt ttattcacta acaaatagct ggtggaatat 360
cgggatcccg atgcaatcct ggtatttact gtactgcaag cgcgggcaac ttcaacgtgc 420
ccaggaacac ctcgaaagac aggctgtgaa ttgcctggca ccgatgatca ccctggaaaa 480
aatcgtgctg ggaaaacgta ctgcagtcag tgagccattg tttcccaact acctgtttgt 540
cgaatttgat ccagaagtga ttcataccac gactatcaac gcgacccgcg gtgtcagtca 600
cttcgtgctg tttggcgcgt cgccagcgat agtcccatcg gcggtgattc atcagctatc 660
ggtatataaaa ccgaaagaca ttgtcgatcc ggcaaccctt tatccgggag ataagggtgat 720
tattaccgaa ggcgcgttcg aaggctttca ggccattttc accgaaccctg atggtgaggg 780
tcgctccatg ctattgctta atcttattaa taaagagatt aagcacagtg tgaagaatac 840
cgagttccgc aaactctata ataaccgggc aggccatgtc tgcccgtatt tcgcgtaagg 900
aatccatta tgtactattt aaaaaacaca aacttttggg tgttcggttt attctttt 958

<210> 14
<211> 31
<212> ADN
<213> *Escherichia coli*

5

<220>
<221> primer_bind
<222> (1)..(31)

<400> 14

10 cgggatccga atgcaatcct ggtatttact g 31

<210> 15
<211> 29
<212> ADN
<213> *Escherichia coli*

15

<220>
<221> primer_bind
<222> (1)..(29)

<400> 15

cggagctctt agagtttgcg gaactcgg 29

20

<210> 16
<211> 45
<212> ADN
<213> *Escherichia coli*

25

<220>
<221> primer_bind
<222> (1)..(45)

ES 2 676 755 T3

<400> 16
 tggattgcc cctatgttc cagatacctg ttatcactta aagct 45
 <210> 17
 <211> 41
 5 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli*
 <220>
 <221> primer_bind
 <222> (1)..(41)
 10 <400> 17
 ttaagtgata acaggtatct gaaacatag gggcaaatcc a 41
 <210> 18
 <211> 22
 <212> ADN
 15 <213> *Escherichia coli*
 <220>
 <221> primer_bind
 <222> (1)..(22)
 <400> 18
 20 tagactggcc cctgaatct cc 22
 <210> 19
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli*
 25 <220>
 <221> primer_bind
 <222> (1)..(32)
 <400> 19
 cgggatcctc caatgactag tctaaaaact ag 32
 30 <210> 20
 <211> 629
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli*
 <220>
 35 <221> primer_bind
 <222> (1)..(629)
 <400> 20

ES 2 676 755 T3

tagactggcc cctgaatct ccagacaacc aatatcactt aaataagtga tagtcttaat	60
actagttttt agactagtca ttggaggatc cgaatgcaat cctgggtattt actgtactgc	120
aagcgcgggc aacttcaacg tgcccaggaa cacctcgaaa gacaggctgt gaattgcctg	180
gcaccgatga tcaccctgga aaaaatcgtg cgtggaaaac gtactgcagt cagtgagcca	240
ttgtttccca actacctggt tgtcgaattt gatccagaag tgattcatac cacgactatc	300
aacgcgaccc gcggtgtcag tcacttcgtg cgctttggcg cgtcgccagc gatagtccca	360
tggcggtga ttcacacagct atcggtatat aaaccgaaag acattgtcga tccggcaacc	420
ccttatccgg gagataaggt gattattacc gaaggcgcgt tcgaaggctt tcaggccatt	480
ttcaccgaac ccgatggtga ggctcgctcc atgctattgc ttaatcttat taataaagag	540
attaagcaca gtgtgaagaa taccgagttc cgcaaactct aagagctctt aagtgataac	600
aggtatctgg aaacataggg gcaaatcca	629

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de preparación de condroitina a partir del precursor polisacárido capsular bacteriano K4 **caracterizado porque** la bacteria *E. coli* K4 comprende múltiples copias modificadas por ingeniería genética de:
- 5 (i) una secuencia que codifica la proteína rfaH de *E. coli*,
o
(ii) una secuencia capaz de hibridarse con la secuencia codificante de rfaH de *E. coli* en las siguientes condiciones rigurosas: 1,2-1,8 x HPB a una temperatura comprendida entre 40 y 50 °C
- se cultiva y amplifica, seguido de tratamiento hidrolítico en el caldo de fermentación empobrecido sin biomasa, permitiendo la conversión de polisacárido K4 en condroitina y fructosa.
- 10 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha secuencia codificante de rfaH está comprendida dentro del casete de expresión que tiene la secuencia SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 20.
3. Procedimiento según las reivindicaciones 1-2, en el que el organismo productor es la cepa EcK4 de *Escherichia coli* que tiene, como polisacárido capsular, condroitina fructosilada en la posición 3 de los restos de ácido glucurónico.
- 15 4. Procedimiento según la reivindicación 3, en el que la cepa K4 de *E. coli* se selecciona del grupo que consiste en: ATCC 235021 (American Type Culture Collection - USA), cepa Bi 8337/41 (International Escherichia Centre-Dinamarca), cepa NCTC 9005 (National Collection of Type Cultures - UK), cepa U1-41 2616 (colección Freiburgn).
5. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la secuencia codificante de la proteína rfaH se modifica por ingeniería mediante inserción de múltiples copias de genes que están comprendidas en el ADN cromosómico,
20 elementos plasmídicos o elementos transponibles.
6. Procedimiento según la reivindicación 5, en el que dicho elemento plasmídico es un plásmido endógeno en K4.
7. Procedimiento según la reivindicación 6, **caracterizado porque** dicho elemento plasmídico comprende al menos las secuencias ID NO: 1 e ID NO: 6.
8. Procedimiento según las reivindicaciones 1-7, en el que la secuencia codificante de la proteína rfaH se modifica por ingeniería genética mediante inserción de un promotor constitutivo.
25
9. Procedimiento según la reivindicación 8, en el que dicho promotor constitutivo se selecciona del grupo que consiste en: multipromotor del gen que codifica la gliceraldehído-3-P deshidrogenasa y un promotor de otras proteínas constitutivas de *E. coli*, y fragmentos funcionalmente equivalentes de los mismos.
10. Procedimiento según las reivindicaciones 1-9, en el que el crecimiento bacteriano y la amplificación se llevan a cabo en condiciones de fermentación discontinua, y en el que, al final de la fase discontinua, a medida que disminuyen los nutrientes, la fermentación se lleva a cabo en un régimen semidiscontinuo mediante la adición de una solución de nutrientes concentrada.
30
11. Procedimiento según la reivindicación 10, en el que:
- 35 a) la fase discontinua se lleva a cabo durante un tiempo que varía de 6 a 8 horas y la concentración de biomasa expresada en peso húmedo varía del 0,6 al 1 %;
b) la fase semidiscontinua, que se activa cuando el crecimiento microbiano tiende a disminuir debido al empobrecimiento de nutrientes, generalmente después de 7-8 h de fermentación, se lleva a cabo durante un tiempo que varía de 6 a 12 horas y la concentración de biomasa expresada en peso húmedo varía de 15 a 40 g l⁻¹;
- 40 en la que, opcionalmente, la fase semidiscontinua b) se integra con la microfiltración del caldo de fermentación que se puede activar con una disminución de la tasa de crecimiento microbiano debido a la acumulación de catabolitos tóxicos.
12. Procedimiento según la reivindicación 11, en el que dicha microfiltración del caldo de fermentación se lleva a cabo después de 12-48 horas de crecimiento microbiano y en el que el volumen fermentado se mantiene constante mediante la adición de solución salina con la misma composición que la utilizada en el medio de cultivo, que tiene una concentración de biomasa expresada en peso húmedo que varía de 40 a 160 g l⁻¹.
45
13. Procedimiento según las reivindicaciones 11-12, en el que la fase de microfiltración se lleva a cabo con membranas de configuración plana o membranas de fibra hueca, con un límite entre 0,1 y 0,5 µm que funciona con un flujo tangencial de 80-120 l(min·m²)⁻¹.
- 50 14. Procedimiento según la reivindicación 13, en el que la fase de microfiltración se lleva a cabo con membranas de configuración plana o membranas de fibra hueca, con un límite entre 0,1 y 0,2 µm que funciona con un flujo

tangencial de 90-100 l(min·m²)⁻¹.

15. Procedimiento para la preparación de sulfato de condroitina **caracterizado porque** se utiliza el procedimiento según las reivindicaciones 1-14 y adicionalmente comprende una sulfatación química selectiva de sitio de condroitina.

- 5 16. Cepa K4 de *Escherichia coli*, **caracterizada porque** comprende múltiples copias de un gen rfaH modificado por ingeniería genética, que, como alternativa o en combinación, están comprendidas en el ADN cromosómico, elementos plasmídicos o elementos transponibles, en el que la secuencia codificante de la proteína rfaH es:

- 10 (i) una secuencia que codifica la proteína rfaH de *E. coli*,
o
(ii) una secuencia capaz de hibridarse con la secuencia codificante de rfaH de *E. coli* en las siguientes condiciones rigurosas: 1,2-1,8 x HPB a una temperatura comprendida entre 40 y 50 °C.