CAPÍTULO REIVINDICATORIO

1. Un método para la producción de CRM_{197} con alto rendimiento utilizando cepa diseñada de *Corynebacterium diphtheriae* que tiene el número de copias incrementado del gen CRM_{197}, caracterizado porque el método comprende cultivar la cepa en un medio de fermentación no desferrado que comprende más de 10 aminoácidos diferentes de tirosina y asparagina y que está libre de componentes derivados de animales, en donde no se emplea maltosa como fuente de carbono.

2. El método de conformidad con la Reivindicación 1, caracterizado porque el método comprende suplementar el medio con nutrientes.

3. El método de conformidad con la Reivindicación 2, caracterizado porque el suplemento con nutrientes se basa en el modelo de flujo metabólico.

4. El método de conformidad con la Reivindicación 1, caracterizado porque los aminoácidos se seleccionan a partir de alanina, arginina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, valina y sus sales.

5. El método de conformidad con la Reivindicación 4, caracterizado porque cada aminoácido se utiliza en una cantidad de 0.05 a 2 g/L.

6. El método de conformidad con la Reivindicación 1, caracterizado porque el medio de fermentación no desferrado comprende fenilalanina y arginina en una cantidad menor a 1 g/L.

7. El método de conformidad con la Reivindicación 2, caracterizado porque los nutrientes se seleccionan a partir de vitaminas tales como ácido nicotínico, tiamina, ácido pantoténico, biotina, riboflavina, ácido fólico; ácido pimélico; fosfato, una fuente de nitrógeno y metales traza.

8. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque el medio de fermentación es no desferrado y está completamente libre de componentes derivados de animales.

9. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque la composición del medio de fermentación comprende medios de fermentación base que comprenden extracto de levadura, peptona vegetal, fosfato monopotásico (KH_2PO_4), triptófano, glucosa, solución de sales traza YC.

10. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque el método comprende suplementar el medio con glucosa durante todo el proceso de fermentación.

11. Un método para la producción de CRM_{197} caracterizado porque el método comprende:

i) cultivar la cepa diseñada de *Corynebacterium diphtheriae* que tiene el número de copias incrementado del gen CRM_{197} en un medio de fermentación no desferrado que está libre de componentes derivados de animales y comprende medios base y más de 10 aminoácidos que se seleccionan a partir de alanina, arginina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, valina y sus sales y

ii) suplementar el medio con glucosa y nutrientes basados en el modelo de flujo metabólico, en donde no se emplea maltosa como fuente de carbono.

12. Un método para la producción de CRM_{197}, cuyo método comprende cultivar la cepa diseñada de *Corynebacterium diphtheriae* que tiene el número de copias incrementado del gen CRM_{197} en un medio de fermentación no desferrado que está libre de componentes derivados de animales y comprende más de 10 aminoácidos diferentes de tirosina y asparagina, y suplementar el medio con nutrientes basados en el modelo de flujo metabólico, caracterizado porque cada aminoácido se utiliza en una cantidad de 0.05 a 2 g/L, en donde no se emplea maltosa como fuente de carbono.

13. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque la fermentación se lleva a cabo a una temperatura entre 30 a 40 °C y a un pH en el intervalo de 7.0 a 8.0, de preferencia 7.4 a 7.6.

14. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque el método produce de 150 mg/L a 500 mg/L de CRM_{197}.