

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 716 876**

51 Int. Cl.:

C12P 7/02	(2006.01)	C12N 9/88	(2006.01)
C12P 7/24	(2006.01)	C12N 1/20	(2006.01)
C12P 7/16	(2006.01)		
C12N 9/04	(2006.01)		
C12N 9/10	(2006.01)		
C12N 15/52	(2006.01)		
C12N 15/67	(2006.01)		
C12N 15/70	(2006.01)		
C12N 15/74	(2006.01)		
C12N 1/16	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2012 PCT/US2012/029013**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **20.09.2012 WO12125688**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2012 E 12758227 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.12.2018 EP 2686432**

54 Título: **Síntesis microbiana de aldehídos y alcoholes correspondientes**

30 Prioridad:

14.03.2011 US 201161452519 P

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

17.06.2019

73 Titular/es:

**EASEL BIOTECHNOLOGIES, LLC (100.0%)
11755 Wilshire Blvd, Suite 2000
Los Angeles, California 90025, US**

72 Inventor/es:

**HIGASHIDE, WENDY M.;
CHO, KWANG MYUNG y
RABIZADEH, SHAHROOZ**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 716 876 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

Síntesis microbiana de aldehídos y alcoholes correspondientes

Esta solicitud reivindica la prioridad de la solicitud provisional de Estados Unidos de los autores de la presente invención en tramitación con la presente, número de serie 61/452,519, que se presentó el 14 de marzo de 2011.

5 **Campo de la invención**

El campo de la invención es la ingeniería metabólica de microorganismos para producir uno o más productos químicos, y especialmente aldehídos, que a continuación se aíslan y se convierten *ex vivo* en los alcoholes correspondientes.

Antecedentes de la invención

10 La producción y el consumo mundiales de aldehídos y otros productos oxoquímicos fueron de casi 9,6 millones de toneladas métricas en 2005. La utilización de la capacidad mundial aumentó a 84% en 2005 a partir de 79% en 2001 como resultado de una mayor demanda, un aumento de la producción y una capacidad racionalizada. Entre 2001 y 2005, la capacidad mundial de aldehídos y otros productos oxoquímicos creció a una tasa promedio anual de 1,6%, una tasa más baja que el consumo mundial, que creció a una tasa promedio anual de 3,4% durante el mismo período.

15 Muy comúnmente, los aldehídos y otros productos oxoquímicos se producen actualmente mediante métodos de refinación utilizando productos petroquímicos derivados del craqueo de petróleo bruto. Por ejemplo, los aldehídos de C3 a C15 se generan a través de la hidroformilación de olefinas con gas de síntesis, y los aldehídos así producidos se convierten a continuación en los alcoholes, ácidos u otros derivados correspondientes. Actualmente, el producto oxoquímico de mayor demanda es el n-butiraldehído, seguido de los aldehídos C6-C13 para alcoholes plastificantes, y el isobutiraldehído y los aldehídos C12-C18 para alcoholes detergentes.

20 La síntesis microbiana de biocombustibles utilizando células microbianas modificadas por ingeniería metabólica, y especialmente la producción de alcoholes C2-C6 son bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, la producción de etanol microbiano a partir de carbohidratos se describe en el documento WO 94/06924 y se hace referencia a la producción de etanol a partir de CO₂ en la Patente de Estados Unidos Núm. 8.048.666. La producción de alcohol de cadena corta a partir de 2-cetoácidos utilizando células modificadas por ingeniería metabólica se describe en la Solicitud de Patente de Estados Unidos Núm. 2009/0081746, y numerosas publicaciones se refieren a la producción de isobutanol a partir de células modificadas por ingeniería metabólica (p. ej., Patentes de Estados Unidos Núm. 7.851.188 y 7.993.889, y documentos WO 2009/086423, WO 2009/149240, WO 2010/062597 y WO 2010/075504), y la producción de alcohol a partir de CO₂ utilizando organismos fotosintéticamente activos se describe en el documento US2011/0250660. También fueron descritos métodos similares por Kechun Zhang et al. en Proc. Nat. Acad. Sci. (2008), 105, núm. 52: 20653-20658. La producción de alcoholes C5-8 a partir de 2-cetoácidos utilizando células modificadas por ingeniería metabólica se describió en la Solicitud de Patente de Estados Unidos Núm. 2011/0201083, y se informó sobre la producción de aldehídos grasos a partir de diversas fuentes de carbono en la Patente de Estados Unidos Núm. 8.097.439. Estos y todos los demás materiales extrínsecos comentados en la presente memoria se incorporan como referencia en su totalidad. Cuando una definición o utilización de un término en una referencia incorporada es inconsistente o contraria a la definición de ese término proporcionada en la presente memoria, se aplica la definición de ese término proporcionada en la presente memoria y no se aplica la definición de ese término en la referencia.

30 35 40 45 Desafortunadamente, el rendimiento de alcohol utilizando muchos de tales procedimientos es todavía relativamente bajo. Para mejorar el rendimiento de al menos ciertos alcoholes, se pueden eliminar o suprimir las alcohol deshidrogenasas endógenas, y se pueden reemplazar por una deshidrogenasa recombinante como se describe en el documento WO 2009/149240A1. Si bien tales modificaciones son a menudo deseables al menos en cierta medida, surgen otros problemas. Por ejemplo, varios alcoholes son tóxicos para las células que producen el alcohol por encima de una concentración umbral, lo que tiende a limitar el rendimiento general. Además, la mayoría de los alcoholes microbianos sintetizados son completamente miscibles con el medio de fermentación y necesitan un procedimiento de aislamiento que consume bastante energía. Peor aún, algunos de los alcoholes para mezclas azeotrópicas son aún más difíciles de separar del medio.

50 De ese modo, a pesar de que en la técnica se conocen numerosos sistemas y métodos de producción de aldehídos, productos oxoquímicos y alcoholes correspondientes, todavía existen varias dificultades. Por lo tanto, todavía hay una necesidad de mejora, particularmente cuando tales productos químicos se producen utilizando un sistema microbiano.

55 El documento WO 2009/120796 A1 describe métodos para producir acetaldehído a partir de recursos biológicos renovables, por ejemplo, a partir de un sustrato fermentable. Realizaciones particulares ofrecen la producción de acetaldehído a partir de piruvato, en donde el piruvato es generado a partir de diversas fuentes de carbono por microorganismos productores de piruvato. Los métodos comprenden cultivar un microorganismo productor de piruvato en un medio de cultivo en condiciones tales que el piruvato se excrete y se acumule extracelularmente.

El documento WO2009/149270A2 describe un método para elaborar butanol a partir de al menos una fuente de carbono fermentable mediante fermentación utilizando un anfitrión microbiano recombinante en donde el butanol se extrae en extractantes orgánicos específicos durante la fermentación.

5 El documento WO2013/067325A1 describe microorganismos y métodos para producir n-butiraldehído en los que un microorganismo es modificado para mejorar la conversión de una fuente de carbono en n-butiraldehído. El n-butiraldehído se recupera por medio de un procedimiento de separación por evaporación de gas que ocurre durante el procedimiento de conversión.

Compendio de la invención

10 La presente invención se presenta en las reivindicaciones adjuntas. Generalmente se dirige a métodos para la producción de compuestos de aldehído y alcohol utilizando un procedimiento sintético mixto en el que una célula microbiana modificada por ingeniería metabólica utiliza una fuente de carbono para producir un aldehído que a continuación se elimina continuamente en la fase de vapor del medio de fermentación. En aspectos particularmente preferidos, la célula microbiana modificada por ingeniería metabólica carece sustancialmente de producción de alcohol. El aldehído se condensa a continuación a partir de la fase de vapor y se reduce *ex vivo* al alcohol correspondiente. Los métodos contemplados ventajosamente superan diversas dificultades, especialmente diversos problemas asociados con la inhibición del producto y la separación de los alcoholes del medio de fermentación.

15 Un método para producir un alcohol generalmente incluye una etapa de crecimiento de una pluralidad de células microbianas en un medio de fermentación (preferiblemente con glucosa, fructosa, sacarosa, almidón, celulosa, una hemicelulosa, glicerol, dióxido de carbono, una proteína, un lípido y/o un aminoácido como fuente de carbono), en donde las células se modifican genéticamente para que presenten un aumento de actividad metabólica en comparación con las células no modificadas genéticamente. El aumento de la actividad metabólica es un aumento de la conversión de piruvato o 2-cetobutirato en un aldehído, y una disminución de la actividad de la alcohol deshidrogenasa. El aldehído producido por las células se elimina de forma continua o semi-continua del medio de fermentación en la fase de vapor. En otra etapa, el aldehído se condensa a partir de la fase de vapor, y en otra etapa más, el aldehído condensado se reduce al alcohol correspondiente.

20 El aumento de la actividad metabólica es un aumento de la conversión de piruvato en acetaldehído a través de la expresión de una piruvato descarboxilasa recombinante, o el aumento de la actividad metabólica es un aumento de la conversión de 2-cetobutirato en un aldehído, p. ej. propanal, a través de la expresión de una 2-cetoisovalerato descarboxilasa recombinante. Adicionalmente, o alternativamente, se prefiere que las células microbianas también presenten un aumento de actividad metabólica en la descarboxilación de uno o más de 2-cetovalerato, 2-cetocaproato, 2-cetoheptanoato, 2-cetooctanoato, 2-ceto-3-metilvalerato, 2-ceto-4-metilcaproato, 2-ceto-5-metilheptanoato, 2-ceto-6-metiloctanoato, 2-ceto-isovalerato, 2-cetoisocaproato, 2-ceto-5-metilhexanoato, o 2-ceto-6-metiloctanoato a través de una 2-cetoisovalerato descarboxilasa recombinante. Por lo tanto, la fermentación especialmente preferida incluye acetaldehído, propanal, butanal y 2-metil-1-propanal.

30 En otros aspectos adicionales contemplados, las células microbianas presentan un aumento de actividad metabólica en la elongación de la cadena carbonada ramificada de 2-cetobutirato a 2-ceto-3-metilvalerato a través de genes *ilvGMCD* recombinantes o genes *ilvBNCD* recombinantes, y/o un aumento de actividad metabólica en elongación de la cadena carbonada ramificada de piruvato a 2-ceto-isovalerato a través de genes *alsS-ilvCD* recombinantes o genes *ilvIHCD* recombinantes. Es todavía más particularmente preferido que las células microbianas también presenten un aumento de actividad metabólica en la elongación de la cadena carbonada lineal a través de los genes *leuABCD* recombinantes.

Aunque no limita al objeto de la invención, generalmente se prefiere que la disminución de la actividad alcohol deshidrogenasa en las células microbianas disminuya al menos 70% y más típicamente al menos 90% en comparación con las células no modificadas genéticamente.

45 En métodos particularmente preferidos, la etapa de eliminación del aldehído en la fase de vapor incluye la agitación del medio de fermentación, la separación mediante evaporación del medio de fermentación con un gas inerte, la separación mediante evaporación del medio de fermentación con un gas que contiene oxígeno y/o la unión temporal del aldehído a un agente de unión. El aldehído así aislado se reduce a continuación al alcohol correspondiente, por ejemplo, utilizando reducción electroquímica, reducción enzimática y/o una reducción catalítica con hidrógeno.

50 Las células microbianas adecuadas se seleccionarán entre los géneros *Escherichia*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Ralstonia*, *Zymomonas*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Synechococcus*, *Synechocystis*, *Saccharomyces*, *Pichia*, *Candida*, *Hansenula* y *Aspergillus*. De ese modo, las células microbianas particularmente preferidas incluyen *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Synechococcus elongatus*, *Ralstonia eutropha* y *Saccharomyces cerevisiae*.

55 Por lo tanto, y visto desde una perspectiva diferente, un método para producir una célula microbiana modificada mediante ingeniería metabólica para su uso en un procedimiento de producción en el que un producto de valor (p. ej., alcohol) es producido *ex vivo* a partir de un aldehído incluye una etapa de modificación genética de las células microbianas para que presenten un incremento de conversión de piruvato en un aldehído mediante la expresión de una piruvato descarboxilasa recombinante o de 2-cetobutirato en un aldehído mediante la expresión de una 2-

cetoisovalerato descarboxilasa recombinante, y una etapa adicional de modificación genética de las células microbianas para que presenten una disminución de actividad de la alcohol deshidrogenasa de manera que la célula microbiana esté sustancialmente desprovista de producción de alcohol. En otra etapa más, las células microbianas modificadas se someten a ensayo para determinar la generación en un medio de fermentación de un aldehído volátil en una cantidad suficiente para permitir la separación mediante evaporación del aldehído volátil a partir del medio de fermentación para permitir de ese modo una conversión *ex vivo* del aldehído en el producto de valor (p. ej., reducción del aldehído a un alcohol correspondiente).

En aspectos especialmente preferidos, la célula microbiana presenta un aumento de actividad metabólica en la conversión de 2-cetobutirato en propanal a través de una 2-cetoisovalerato descarboxilasa recombinante. Adicionalmente, o alternativamente, la célula microbiana presenta un aumento de actividad metabólica en la elongación de la cadena carbonada lineal a través de los genes *leuABCD* recombinantes, y/o un aumento de actividad metabólica en la elongación de la cadena carbonada ramificada de 2-cetobutirato a 2-ceto-3-metilvalerato a través de genes *ilvGMCD* recombinantes o genes *ilvBNCD* recombinantes o en la elongación de la cadena carbonada ramificada de piruvato a 2-ceto-isovalerato a través de genes *alsS-ilvCD* recombinantes o genes *ilvIHCD* recombinantes.

Varios objetos, características, aspectos y ventajas del objeto de la invención se harán más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de las realizaciones preferidas, junto con las figuras de los dibujos adjuntos en las que números similares representan componentes similares.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1A es un esquema ilustrativo para rutas metabólicas que producen aldehídos de cadena lineal.

La Figura 1B es un esquema ilustrativo de rutas metabólicas que producen aldehídos de cadena ramificada.

Descripción detallada

Los autores de la presente invención han descubierto que las células microbianas se pueden modificar mediante ingeniería metabólica para aumentar sustancialmente la producción de varios aldehídos (especialmente volátiles) que no son metabolizados, o los son solamente en un grado insignificante, a los alcoholes correspondientes. Este enfoque es particularmente inesperado ya que los aldehídos son típicamente significativamente más tóxicos que los alcoholes correspondientes, y que los aldehídos se producirán (y potencialmente se acumularán en la célula) a una tasa aún más rápida debido a la supresión de las alcohol deshidrogenasas endógenas. Los aldehídos así producidos se eliminan a continuación del medio de fermentación en la fase de vapor, preferiblemente mediante separación mediante evaporación del medio con un gas de separación mediante evaporación de manera continua o semicontinua (es decir, de manera intermitente durante todo el procedimiento de fermentación utilizando al menos dos periodos de eliminación).

La célula microbiana está modificada genéticamente para que presente una mayor conversión de piruvato o 2-cetobutirato en un aldehído, y una menor actividad de la alcohol deshidrogenasa. La mayor conversión de piruvato o 2-cetobutirato en aldehído se debe muy típicamente a la presencia de una o más construcciones de ácido nucleico (p. ej., proporcionadas en forma de plásmidos y/o integrados en el genoma de la célula anfitriona) que codifican uno o más genes que conducen a la formación de enzimas que catalizan una reacción en la conversión de piruvato o 2-cetobutirato en aldehído. Por lo tanto, en la mayoría de los casos, la mayor conversión se debe a un mayor rendimiento de los metabolitos a través de una secuencia de reacciones bioquímicas en la célula que conducen a los productos finales de aldehído deseados. Por supuesto, se debe apreciar que una o más enzimas endógenas (no recombinantes) pueden ser parte de la secuencia de reacciones bioquímicas en la célula.

La Figura 1A representa un conjunto de rutas modificadas por ingeniería metabólica ilustrativas para aumentar la producción de aldehídos de cadena lineal en una célula. Aquí, el acetaldehído se forma a partir del piruvato a través de la enzima piruvato descarboxilasa (*pdc*), y el propanal se forma a partir de 2-cetobutirato (2-KB) a través de la enzima 2-cetoisovalerato descarboxilasa (*kivD*). Para llegar a productos de cadena más larga, incluyendo butanal, pentanal, hexanal, heptanal, etc., las rutas de modificación por ingeniería metabólica pueden incluir adicionalmente los genes que codifican una 2-isopropilmalato sintasa (*leuA*), una 3-isopropilmalato deshidrogenasa (*leuB*), una subunidad grande de 3-isopropilmalato isomerasa (*leuC*) y una subunidad pequeña de 3-isopropilmalato isomerasa (*leuD*). Muy preferiblemente, estos genes están dispuestos en un operón bajo el control apropiado para la expresión en una célula. De este modo, las células modificadas para expresar *leuABCD* y *kivD* serán adecuadas para la producción de butanal, pentanal, hexanal, heptanal, etc. a partir de 2-cetobutirato como se representa a través de la extensión de cadena sucesiva de 2-KB a 2-cetovalerato (2-KV), 2-cetocaproato (2-KC), 2-cetoheptanoato (2-KH), y 2-cetooctanoato (2-KO) y descarboxilación final.

La Figura 1B representa otro conjunto de rutas modificadas por ingeniería metabólica ilustrativas para aumentar la producción de aldehídos de cadena ramificada en una célula. Aquí, 2-KB se ramifica a 2-Ket-3-metilvalerato (2-K-3-MV) a través de la acción de productos génicos de la subunidad grande de acetohidroxi ácido sintasa II (*ilvG*), la subunidad pequeña de acetohidroxi ácido sintasa II (*ilvM*), la acetohidroxi ácido isomeroreductasa (*ilvC*) y la dihidroxi ácido deshidratasa (*ilvD*) o la subunidad grande de la acetohidroxi ácido sintasa I (*ilvB*), la subunidad

pequeña de la acetohidroxi ácido sintasa I (ilvN), la acetohidroxi ácido isomeroreductasa (ilvC), y la dihidroxi ácido deshidratasa (ilvD). El 2-K-3-MV se puede descarboxilar a continuación mediante kivD para formar 2-metil-1-butanal, o se puede elongar sucesivamente por medio de proteínas codificadas por leuABCD a 2-ceto-4-metilhexanoato (2-K-4MH) o 2-ceto-5-metilheptanoato (2-K-5Mhp) antes de la descarboxilación por kivD para formar los respectivos 3-metil-1-pentanal y 4-metil-1-hexanal (y productos ramificados más largos). Cuando el material de partida es piruvato, el piruvato se ramifica primero por los productos de expresión de los genes de la acetolactato sintasa (alsS), la acetohidroxi ácido isomeroreductasa (ilvC) y la dihidroxi ácido deshidratasa (ilvD), preferiblemente dispuestos en un casete de expresión funcional alsS-ilvCD, o los productos de expresión de los genes de la subunidad grande de la acetohidroxi ácido sintasa III (ilvI), la subunidad pequeña de la acetohidroxi ácido sintasa III (ilvH), la acetohidroxi ácido isomeroreductasa (ilvC), y la dihidroxi ácido deshidratasa (ilvD) para formar 2-cetoisovalerato (2-KIV). La descarboxilación de 2-KIV proporciona 2-metil-1-propanal, mientras que la elongación de la cadena a través de los productos de expresión de leuABCD proporciona 2-cetoisocaproato (2-KIC) y 2-ceto-5-metilhexanoato (2-K-5Mhx) y productos superiores. Como antes, 2-KIC y 2-K-5Mhx se descarboxilan a continuación a los correspondientes 3-metil-1-butanal y 4-metil-1-pentanal, y productos superiores.

Por lo tanto, en los aspectos especialmente preferidos del objeto de la invención, las células microbianas contempladas en la presente memoria presentarán un aumento de actividad metabólica en la elongación de la cadena carbonada ramificada de 2-cetobutirato a 2-ceto-3-metilvalerato a través de la expresión de genes ilvGMCD recombinantes o la expresión de genes ilvBNCD recombinantes y/o un aumento de la actividad metabólica en la elongación de la cadena carbonada ramificada de piruvato a 2-ceto-isovalerato a través de la expresión de los genes alsS-ilvCD recombinantes o la expresión de los genes ilvHCD recombinantes.

En otros aspectos aún más preferidos, las células contempladas también presentarán un aumento de actividad metabólica en la descarboxilación de uno o más de 2-cetovalerato, 2-cetocaproato, 2-cetoheptanoato, 2-cetooctanoato, 2-ceto-3-metilvalerato, 2-ceto-4-metilcaproato, 2-ceto-5-metilheptanoato, 2-ceto-6-metiloctanoato, 2-ceto-isovalerato, 2-cetoisocaproato, 2-ceto-5-metilhexanoato, o 2-ceto-6-metiloctanoato a través de la expresión de una 2-cetoisovalerato descarboxilasa recombinante (preferiblemente kivD), y/o un aumento de la actividad metabólica en la conversión de piruvato en acetaldehído a través de la expresión de una piruvato descarboxilasa recombinante, y/o un aumento de la actividad metabólica en la conversión de 2-cetobutirato en propanal a través de la expresión de una 2-cetoisovalerato descarboxilasa recombinante. En aspectos particularmente preferidos, las células serán modificadas genéticamente adicionalmente para que presenten un aumento de actividad metabólica en la elongación de la cadena carbonada lineal a través de la expresión de genes leuABCD recombinantes.

Por supuesto, se debe reconocer que todos los genes pueden no estar modificados o pueden estar modificados para conferir una selectividad deseada, una mayor tasa de recambio, etc. (véase, p. ej., Proc. Nat. Acad. Sci. (2008), 105, núm. 52: 20653-20658; documento WO2009/149240A1). Los genes adecuados para las actividades de las células modificadas por ingeniería metabólica son bien conocidos en la técnica, y el uso de todos ellos junto con las enseñanzas presentadas en la presente memoria se considera adecuado. Por otra parte, todas las formas conocidas de producción de células modificadas por ingeniería metabólica también se consideran adecuadas para su uso en la presente memoria. Por ejemplo, las células modificadas por ingeniería metabólica se pueden modificar por inserción genómica de uno o más genes, operones o transfección con plásmidos o fagémidos como es bien conocido en la técnica. En algunas realizaciones, también se puede utilizar un microorganismo mutante en los métodos de la presente invención, y se puede modificar adicionalmente de forma recombinante según se desee.

En aspectos particularmente preferidos adicionales, la actividad de la alcohol deshidrogenasa endógena está como mínimo reducida, y más preferiblemente suprimida, y se debe tener en cuenta que en los aspectos preferidos, todas o casi todas las alcohol deshidrogenasas serán suprimidas o eliminadas. Por ejemplo, las deshidrogenasas suprimidas o eliminadas incluyen adhE, IdhA, frdB y pflB. También se observa que la actividad de la deshidrogenasa se puede suprimir o eliminar de muchas maneras bien conocidas, incluyendo la regulación a la baja (p. ej., a través de ARN antisentido o ARNip) o la desorganización de un gen que codifica la deshidrogenasa, la introducción de una mutación para la disminución de la expresión de un gen o para la inactivación de la expresión de un gen, etc.). En consecuencia, las células modificadas genéticamente contempladas tendrán más de una deshidrogenasa mutada o suprimida de otro modo.

Visto desde una perspectiva diferente, por lo tanto, se contempla que las células modificadas genéticamente no produzcan ninguna cantidad significativa de alcoholes de cadena corta (hasta C6, lineal o ramificada). Por ejemplo, tales células modificadas liberarán en el medio de fermentación cantidades significativamente mayores de aldehídos en relación con los alcoholes correspondientes, muy típicamente a una razón molar de un aldehído con respecto a un alcohol correspondiente (p. ej., butiraldehído con respecto a butanol) de al menos 3:1, más típicamente al menos 4:1, y muy típicamente al menos 5:1. En consecuencia, el alcohol de cadena corta total (hasta C6, lineal o ramificado) en el medio de fermentación será inferior a 1% en peso del medio de fermentación, más típicamente inferior a 0,5% en peso, muy típicamente inferior a 0,1% en peso. Por lo tanto, en aspectos especialmente preferidos, las células modificadas no producirán ningún alcohol detectable (es decir, menos de 10 mg/l de medio de fermentación).

El microorganismo recombinante puede ser cualquier microorganismo adecuado, incluyendo bacterias, cianobacterias o un hongo. Sin embargo, los microorganismos no fotosintéticamente activos son particularmente

preferidos. Por lo tanto, en algunas realizaciones, las células microbianas pertenecen a un género seleccionado del grupo que consiste en *Escherichia*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Ralstonia*, *Zymomonas*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Synechococcus*, *Synechocystis*, *Saccharomyces*, *Pichia*, *Candida*, *Hansenula* y *Aspergillus*. En realizaciones preferidas, el microorganismo consiste en *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Synechococcus elongatus*, *Ralstonia eutropha* y *Saccharomyces cerevisiae*.

Además, se debe apreciar que las condiciones de cultivo dependerán típicamente de la elección particular del microorganismo, y el experto en la técnica podrá elegir fácilmente el medio apropiado. Entre otras opciones adecuadas, generalmente se prefiere que la fuente de carbono en el medio sea un sacárido, y particularmente glucosa, fructosa, sacarosa, almidón, celulosa, una hemicelulosa, glicerol, dióxido de carbono, una proteína y/o un aminoácido. Sin embargo, numerosas fuentes alternativas de carbono también se consideran adecuadas, y otras fuentes de carbono ilustrativas incluyen lípidos, proteínas, CO₂, CH₄, mezclas orgánicas complejas (p. ej., sólidos biológicos, productos de desecho de procesamiento de carne, materiales de origen vegetal, etc.). Independientemente de las condiciones de cultivo en particular, el aldehído volátil se elimina del medio de fermentación en fase de vapor. Más preferiblemente, tal eliminación se realizará de manera continua durante el cultivo celular, y la eliminación se puede basar en la agitación del medio de fermentación, la separación mediante evaporación del medio de fermentación con un gas inerte, la separación mediante evaporación del medio de fermentación con un gas que contiene oxígeno, y/o la unión temporal del aldehído a un agente de unión. Alternativamente, la eliminación de aldehído también se puede realizar después de la fermentación, o de manera semicontinua (p. ej., por contacto intermitente con gas de separación mediante evaporación).

Con respecto al procesamiento adicional, se debe reconocer que la condensación del aldehído se puede realizar de varias maneras, preferiblemente utilizando un condensador bien conocido en la técnica, y que el aldehído producto así condensado se puede purificar adicionalmente en una o más etapas utilizando métodos convencionales, o se puede utilizar directamente en una reacción de reducción para producir el alcohol correspondiente. Existen numerosas reacciones de reducción para los aldehídos conocidas en la técnica, y todas ellas se consideran adecuadas para su uso en la presente memoria. Por ejemplo, las reacciones de reducción especialmente adecuadas incluyen reducción electroquímica, reducción enzimática y reducción catalítica con hidrógeno.

Por lo tanto, se debe apreciar que un método para producir una célula microbiana modificada por ingeniería metabólica para su uso en un procedimiento de producción de alcohol incluirá la modificación genética de las células microbianas para que presenten un incremento en la conversión de piruvato o 2-cetobutirato en un aldehído; la modificación genética de las células microbianas para que presenten una menor actividad de la alcohol deshidrogenasa de modo que la célula microbiana esté sustancialmente desprovista de producción de alcohol; y el ensayo de las células microbianas modificadas para la generación en un medio de fermentación de un aldehído volátil en una cantidad suficiente para permitir la separación mediante evaporación del aldehído volátil del medio de fermentación para permitir de ese modo una reducción *ex vivo* del aldehído a un alcohol correspondiente.

Cuando se desee, también se contempla que no sea necesario que las células presentadas en la presente memoria se empleen para la producción de alcohol, sino para la generación de diversos aldehídos, y especialmente de aldehídos volátiles. En tal caso, las células se modifican genéticamente como se describe anteriormente y se cultivan en condiciones adecuadas para la producción del aldehído. Muy típicamente, el aldehído así producido se separa mediante evaporación a continuación del medio de cultivo y se condensa para la venta, o para su uso o almacenamiento adicionales.

Además, se debe apreciar que los métodos, las células y los procedimientos contemplados también permitirán ventajosamente la producción de compuestos deseables distintos de los alcoholes en los que un precursor del compuesto deseable es un aldehído. Por ejemplo, cuando el producto de fermentación de la célula modificada genéticamente es acetaldehído, el producto especialmente preferido que se prepara *ex vivo* a partir de acetaldehído es etanol y ácido acético. De manera similar, cuando el producto de fermentación de la célula modificada genéticamente es propionaldehído, el producto especialmente preferido que se prepara *ex vivo* a partir de propionaldehído incluye n-propanol, acetato de n-propilo, ácido propiónico y acetato propionato de celulosa. Del mismo modo, cuando el producto de fermentación de la célula modificada genéticamente es n-butiraldehído, el producto especialmente preferido que se prepara *ex vivo* a partir de n-butiraldehído incluye n-butanol, 2-etilhexanol, polivinil butiral, ácido 2-etilhexanoico, metil amil cetona, ácido n-butírico, acetato de n-butilo, acrilato de n-butilo y acetato butirato de celulosa. Cuando el producto de fermentación de la célula modificada genéticamente es isobutiraldehído, el producto especialmente preferido que se prepara *ex vivo* a partir de isobutiraldehído incluye isobutanol, ácido isobutírico, neopentilglicol, metil isoamil cetona, acetato de isobutilo, acrilato de isobutilo, 2,2,4-trimetil-1,3-pentanodiol, 2,2,4-trimetil-1,3-pentanodiol, monoisobutirato, diisobutirato de 2,2,4-trimetil-1,3-pentanodiol e isobutirato de isobutilo.

Ejemplos

Manipulación de ADN: En los ejemplos se utilizaron tecnologías de ADN recombinante convencionales, que son bien conocidas por el experto en la técnica como se describe en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) por Sambrook J et al.

Modificación genética para desactivar la expresión de genes "Knockout": Todas las modificaciones genéticas para desactivar genes se lograron con la transducción de P1 utilizando las cepas de recolección de Keio apropiadas (Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knock-out mutants: The Keio Collection, Mol. Syst. Biol. 2:2006.0008 (2006)). El gen de resistencia a kanamicina se eliminó utilizando pCP20 (One-step inactivation of chromosomal genes in *E. coli* using PCR products, Proc. Natl. Acad. Sci., 97:6640-6645 (2000)) entre cada modificación genética para desactivar genes consecutiva.

Fermentación: Las cepas de *E. coli* se cultivaron durante la noche en LB con antibióticos apropiados a 37°C. Al día siguiente, las células se subcultivaron durante la noche (normalmente 1:100) en matraces de tapón de rosca de 250 ml que contenían 10 - 20 ml de medio M9 (64 g de Na₂HPO₄ • 7H₂O, 15 g de KH₂PO₄, 2,5 g de NaCl, 5 g de NH₄Cl, MgSO₄ 2 mM, CaCl₂ 0,1 mM, 10 mg de tiamina por litro de agua) con 5 g/litro de extracto de levadura, 40 g/litro de glucosa y antibióticos apropiados. Los cultivos se incubaron a continuación a 37°C en un agitador rotatorio (250 rpm). Para reducir la pérdida de isobutiraldehído, los cultivos se enfriaron a 4°C durante 30 minutos antes de la toma de muestras.

Análisis por GC: el isobutiraldehído y el isobutanol se cuantificaron mediante cromatografía de gases (GC) equipada con un FID (detector de ionización de llama). El sistema consistía en un inyector automático modelo 7890A GC y modelo 7693 (Agilent Technologies). Se utilizaron columnas capilares DB-FFAP de 30 m con un diámetro interno de 0,32 mm, de 0,25 µm (Agilent Technologies). La temperatura del horno GC se mantuvo a 85°C durante 3 minutos y se elevó con un gradiente de 45°C/min hasta 225°C y se mantuvo durante 3 minutos. La temperatura del detector y la entrada se mantuvo a 225°C. Se utilizaron hidrógeno, aire y gas helio con velocidades de flujo de 40 ml/min, 450 ml/min, 45 ml/min, respectivamente. El sobrenadante del caldo de cultivo se inyectó en modo de inyección dividida (proporción de la división 1:25) utilizando 1-pentanol como patrón interno.

Construcción de los plásmidos para la producción de isobutiraldehído: pEB121: El plásmido pEB0121 se construyó mediante un ensamblaje de ADN de cuatro fragmentos. El primer fragmento, que contenía el promotor PLlacO1, el origen de replicación p15A y el gen para la resistencia a kanamicina, se amplificó con los cebadores 1 y 2 a partir de un derivado de pZE21-MCS1 (Independent and tight regulation of transcriptional units in *Escherichia coli* via the LacR/O, the TetR/O and AraC/I1-I2 regulatory elements. Nucleic Acids Res 25:1203-10 (1997)). En este derivado de pZE21-MCS1, PLtetO1 se reemplaza por PLlacO1 como resultado de un intercambio de promotores con pZE12-luc (Independent and tight regulation of transcriptional units in *Escherichia coli* via the LacR/O, the TetR/O and AraC/I1-I2 regulatory elements. Nucleic Acids Res 25:1203-10 (1997)) utilizando los sitios de restricción AatI y Acc65I. El segundo fragmento se amplificó con los cebadores 3 y 4 del ADN genómico de *B. subtilis* como molde. El tercer fragmento contenía ilvC, que se amplificó con los cebadores 5 y 6 del ADN genómico de *E. coli* (ATCC 10789D-5) como molde. El cuarto fragmento que contenía ilvD se amplificó con los cebadores 7 y 8 con ADN genómico de *E. coli* (ATCC 10789D-5) como molde.

Cebador 1: 5'-ACGCGTGCTAGAGGCATCAAA-3';

Cebador 2: 5'-TGACCTTTCTCCTCTTTAATGAATTCGGTTCAGTGC-3'; Cebador 3: 5'-TTAAAGAGGAGAAAAGGTACAATGTTGACAAAAGCAACAAAAGAACAAA-3'; Cebador 4: 5'-CATGGTGATTCTCGTCGACCTAGAGAGCTTTTCGTTTTCA-3'; Cebador 5: 5'-GTCGACGAGGAATCACCATTGGCTAACTACTTCAATAC-3'; Cebador 6: 5'-ATGGTATATCTCCTTCCGGTTAACCCGCAACAGCAATAC-3'; Cebador 7: 5'-CCCAGGAGATATACCATGCCTAAGTACCGTTCCGC-3'; Cebador 8: 5'-TTGATGCCTCTAGCACGCGTTTATACCCCCAGTTTCGATT-3'.

pEB5: El plásmido pEB0005 se construyó mediante el ensamblaje de ADN de dos fragmentos. El vector se amplificó mediante la amplificación de pZE12-luc (Independent and tight regulation of transcriptional units in *Escherichia coli* via the LacR/O, the TetR/O and AraC/I1-I2 regulatory elements. Nucleic Acids Res 25:1203-10 (1997)) con los cebadores 9 y 10. El gen *kivd* se amplificó a partir de ADN genómico de *Lactococcus lactis* con los cebadores 11 y 12.

Cebador 9: 5'-TCTAGAGGCATCAAATAAACGAAAGG-3'; Cebador 10: 5'-GGTACCTTTCTCCTCTTTAATGAATTC-3'; Cebador 11: 5'-TTAAAGAGGAGAAAAGGTACCATGTATACAGTAGGATTA-3'; Cebador 12: 5'-TTTTATTTGATGCCTCTAGAATGATTTATTTGTTTCAGCA-3'

Construcción de la cepa anfitriona de producción de isobutiraldehído: Se utilizó *E. coli* BW25113 (Datsenko y Warner 2000) como tipo salvaje. Para eliminar la inducción de IPTG, el gen *lacI* se modificó para desactivar el gen primero. Y a continuación, las principales alcohol deshidrogenasas se modificaron para desactivarlas en serie para construir la cepa plataforma, EB4 (*E. coli*/BW25113Δ*lacI*Δ*adhE*Δ*yqhD*Δ*yiaY*), para la producción de isobutiraldehído. La eliminación de las alcohol deshidrogenasas podría mejorar la producción de isobutiraldehído al bloquear la conversión en isobutanol como se muestra en la Tabla 1 (Todas las cepas albergan dos plásmidos, pEB5 y pEB121).

Tabla 1

Cepa	Isobutiraldehído (g/L)	Isobutanol (g/L)
BW25113	1,4	5,5
BW25113ΔlacI	1,5	5,5
BW25113ΔlacIΔadhE	3,5	3,0
BW25113ΔlacIΔadhEΔyqhD	4,5	1,2
BW25113ΔlacIΔadhEΔyqhDΔyiaY	5,0	0,5

5
10

Eliminación de la producción de isobutiraldehído potenciada por la actividad residual de alcohol deshidrogenasa: Los microorganismos tienen muchos genes de alcohol deshidrogenasa no específicos. Especialmente en *E. coli*, se encontraron más de 100 alcohol deshidrogenasas buscando bases de datos de enzimas. La eliminación de esas alcohol deshidrogenasas no específicas de la cepa EB4 sería beneficiosa para la producción de isobutiraldehído al evitar la conversión en isobutanol. En este ejemplo, los autores de la presente invención eliminaron adicionalmente el gen candidato de la alcohol deshidrogenasa, *yjgB*, para verificar esta hipótesis. Como se muestra en Tabla 2, la eliminación adicional de la actividad residual de la alcohol deshidrogenasa fue beneficiosa para la producción de isobutiraldehído.

Tabla 2

	Isobutiraldehído (g/L)	Isobutanol (g/L)
EB4 (pEB5 + pEB121)	5,49	3,9
EB4ΔyjgB (pEB5 + pEB121)	6,25	2,61

15
20

Modificación genética para desactivar la expresión de genes para rutas metabólicas competitivas para mejorar la producción de isobutiraldehído: La ruta metabólica para la producción de isobutiraldehído tiene varias rutas competitivas para la utilización de intermedios clave, incluidos el piruvato y el 2-cetoisovalerato. Al desactivar aquellos genes de la ruta competitiva, los autores de la presente invención pudieron mejorar el flujo de carbono metabólico hacia su ruta de producción de isobutiraldehído. Para hacer esto, seleccionaron *poxB*, que convierte el piruvato en acetato e *ilvE*, que convierte el 2-cetoisovalerato en L-valina. Como se muestra Tabla 3, se encontró que aumentaba ligeramente la producción de isobutiraldehído. Sin embargo, al combinar esas modificaciones genéticas para desactivar genes de la ruta competitiva, el efecto en la producción de isobutiraldehído fue significativo como se muestra en Tabla 4.

Tabla 3

	Isobutiraldehído (g/L)	Isobutanol (g/L)
EB4 (pEB5 + pEB121)	5,45	1,5
EB4ΔilvE (pEB5 + pEB121)	5,55	1,4
EB4ΔpoxB (pEB5 + pEB121)	5,77	1,5

Tabla 4

	Isobutiraldehído (g/L)	Isobutanol (g/L)
EB4 (pEB5 + pEB121)	7,40	1,7

	Isobutiraldehído (g/L)	Isobutanol (g/L)
EB4ΔilvEΔpoxB (pEB5 + pEB121)	8,30	2,0

5 Debería ser evidente para los expertos en la técnica que son posibles muchas más modificaciones además de las ya descritas sin apartarse de los conceptos de la invención en la presente memoria. El objeto de la invención, por lo tanto, no se debe restringir excepto en el espíritu de las reivindicaciones adjuntas. Además, al interpretar tanto la memoria descriptiva como las reivindicaciones, todos los términos se deben interpretar de la manera más amplia posible y coherente con el contexto. En particular, se debe interpretar que los términos "comprende" y "que comprende" se refieren a elementos, componentes o etapas de una manera no exclusiva, indicando que los elementos, componentes o pasos a los que se hace referencia pueden estar presentes, o se pueden utilizar o combinar con otros elementos, componentes o etapas a los que no se hace referencia expresamente. Cuando las reivindicaciones de la memoria descriptiva se refieren a al menos uno de los elementos seleccionados del grupo que consiste en A, B, C ... y N, se debe interpretar que el texto requiere solo un elemento del grupo, no A más N, o B más N, etc.

Listado de secuencias

15 <110> Easel Biotechnologies, LLC

<120> SÍNTESIS MICROBIANA DE ALDEHÍDOS Y ALCOHOLES CORRESPONDIENTES

<130> 102115.0001PCT

20 <150> 61/452,519
<151> 14-03-2011

<160> 12

25 <170> PatentIn versión 3.4

<210> 1
<211> 21
<212> ADN
30 <213> Artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

35 <400> 1
acgcgtgcta gagcatcaa a 21

<210> 2
<211> 37
40 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
45 <223> oligonucleótido sintético

<400> 2
tgtaccttc tcctcttaa tgaattcggc cagtgcg 37

<210> 3
<211> 48
50 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
55 <223> oligonucleótido sintético

<400> 3
ttaaagagga gaaaggtaca atgttgaca aagcaacaaa agaacaaa 48

ES 2 716 876 T3

<210> 4
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 4
 10 catggtgatt cctcgtcgac ctagagagct ttcgtttca 40
 <210> 5
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Artificial
 15
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 5
 20 gtcgacgagg aatcaccatg gctaactact tcaatac 37
 <210> 6
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Artificial
 25
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 6
 30 atggtatatt tcctccggg ttaaccgcga acagcaatac 40
 <210> 7
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 7
 40 cccggaagga gatataccat gcctaagtac cgttccgc 38
 <210> 8
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Artificial
 45
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 8
 50 ttgatgcctc tagcacgcgt ttaaccccc agtttcgatt 40
 <210> 9
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial
 55
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 9
 60 tctagaggca tcaaataaaa cgaaagg 27
 65

ES 2 716 876 T3

5
<210> 10
<211> 27
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

10
<400> 10
ggtaccttc tcctcttaa tgaattc 27

<210> 11
<211> 40
<212> ADN
15
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

20
<400> 11
ttaaagagga gaaaggtacc atgtatacag taggagatta 40

<210> 12
<211> 40
25
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

30
<400> 12
ttttattga tgcctctaga atgattatt ttgtcagca 40

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir un alcohol, que comprende:

5 cultivar una pluralidad de células microbianas en un medio de fermentación, en donde las células se modifican genéticamente para que presenten un aumento de actividad metabólica en comparación con las células no modificadas genéticamente;

en donde el aumento de la actividad metabólica se caracteriza por aumento de la conversión de piruvato en un aldehído mediante la expresión de una piruvato descarboxilasa recombinante, o de 2-cetobutirato en un aldehído mediante la expresión de una 2-cetoisovalerato descarboxilasa recombinante;

10 en donde la pluralidad de células microbianas se modifican genéticamente adicionalmente para que presenten una disminución de la actividad alcohol deshidrogenasa;

producir el aldehído dentro de las células microbianas y eliminar continuamente el aldehído en una fase de vapor del medio de fermentación;

condensar el aldehído a partir de la fase de vapor; y

reducir el aldehído condensado al correspondiente alcohol.

15 2. El método de la reivindicación 1, en donde las células microbianas presentan un aumento de actividad metabólica en la descarboxilación de uno o más de 2-cetovalerato, 2-cetocaproato, 2-cetoheptanoato, 2-cetooctanoato, 2-ceto-3-metilvalerato, 2-ceto-4-metilcaproato, 2-ceto-5-metilheptanoato, 2-ceto-6-metiloctanoato, 2-ceto-isovalerato, 2-cetoisocaproato, 2-ceto-5-metilhexanoato, o 2-ceto-6-metiloctanoato a través de la expresión de una 2-cetoisovalerato de descarboxilasa recombinante.

20 3. El método de la reivindicación 1, en donde las células microbianas presentan un aumento de actividad metabólica en la elongación de la cadena carbonada ramificada de 2-cetobutirato a 2-ceto-3-metilvalerato a través de la expresión de los genes *ilvGMCD* recombinantes o la expresión de los genes *ilvBNCD* recombinantes.

25 4. El método de la reivindicación 1, en donde las células microbianas presentan un aumento de actividad metabólica en la elongación de la cadena carbonada ramificada de piruvato a 2-ceto-isovalerato a través de la expresión de los genes *alsS-ilvCD* recombinantes o la expresión de los genes *ilvIHCD* recombinantes.

5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 2, 3 ó 4, en donde las células microbianas presentan un aumento de actividad metabólica en la elongación de la cadena carbonada lineal mediante la expresión de genes *leuABCD* recombinantes.

30 6. El método de la reivindicación 1, en donde la disminución de actividad de la alcohol deshidrogenasa en las células microbianas disminuye al menos 70%, y preferiblemente al menos 90%, en comparación con las células no modificadas genéticamente.

35 7. El método de la reivindicación 1, en donde la etapa de eliminación del aldehído en la fase de vapor comprende una etapa seleccionada del grupo que consiste en agitación del medio de fermentación, separación mediante evaporación del medio de fermentación con un gas inerte, separación mediante evaporación del medio de fermentación con un gas que contiene oxígeno, y temporalmente unión del aldehído a un agente de unión.

8. El método de la reivindicación 1, en donde el aldehído se selecciona del grupo que consiste en acetaldehído, propanal, butanal y 2-metil-1-propanal.

40 9. El método de la reivindicación 1, en donde la etapa de reducción del aldehído condensado al alcohol correspondiente se selecciona del grupo de una reducción electroquímica, una reducción enzimática y una reducción catalítica con hidrógeno.

45 10. El método de la reivindicación 1, en donde las células microbianas pertenecen a un género seleccionado del grupo que consiste en *Escherichia*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Ralstonia*, *Zymomonas*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Synechococcus*, *Synechocystis*, *Saccharomyces*, *Pichia*, *Hansenula* y *Aspergillus*, en donde las células microbianas pertenecen preferiblemente a una especie seleccionada del grupo que consiste en *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Synechococcus elongatus*, *Ralstonia eutropha* y *Saccharomyces cerevisiae*.

11. El método de la reivindicación 1, en donde el medio de fermentación tiene una fuente de carbono seleccionada del grupo que consiste en glucosa, fructosa, sacarosa, almidón, celulosa, una hemicelulosa, glicerol, dióxido de carbono, una proteína y un aminoácido.

50 12. Un método para producir una célula microbiana modificada mediante ingeniería metabólica para su utilización en un procedimiento en el que se produce *ex vivo* un producto de valor a partir de un aldehído, que comprende:

modificar genéticamente las células microbianas para que presenten un aumento de una conversión de piruvato en un aldehído mediante la expresión de un piruvato descarboxilasa recombinante, o de 2-cetobutirato en un aldehído mediante la expresión de una 2-cetoisovalerato descarboxilasa recombinante, en donde el aldehído se produce dentro de las células microbianas;

5 modificar genéticamente las células microbianas para que presenten una disminución de actividad de la alcohol deshidrogenasa de modo que la célula microbiana esté sustancialmente desprovista de producción de alcohol; y

10 someter a ensayo las células microbianas modificadas para determinar la generación en un medio de fermentación de un aldehído volátil en una cantidad suficiente para permitir la separación mediante evaporación del aldehído volátil del medio de fermentación para permitir de ese modo una conversión ex vivo del aldehído en el producto de valor.

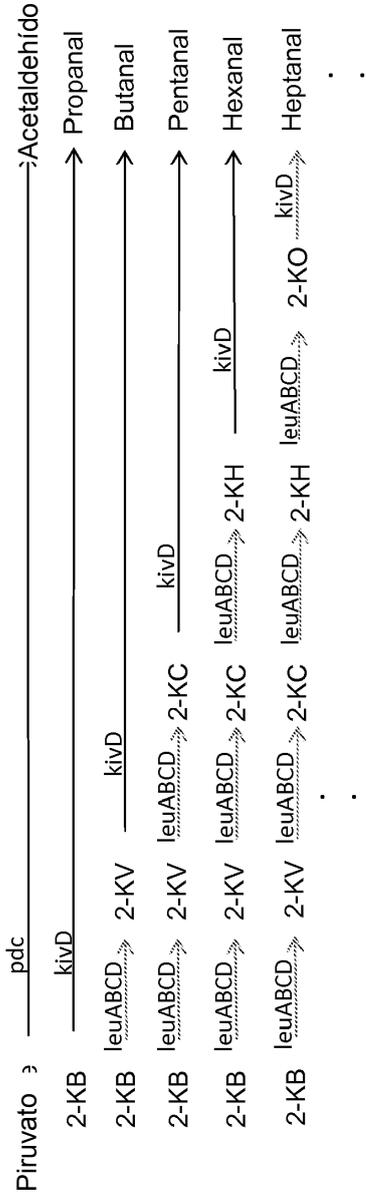
13. El método de la reivindicación 12, en donde la célula microbiana presenta un aumento de actividad metabólica

i) en la elongación de la cadena carbonada lineal mediante la expresión de genes leuABCD recombinantes;

ii) en la elongación de la cadena carbonada ramificada de 2-cetobutirato a 2-ceto-3-metilvalerato a través de la expresión de los genes ilvGMCD recombinantes o la expresión de los genes ilvBNCD recombinantes; o

15 iii) en la elongación de la cadena carbonada ramificada de piruvato a 2-ceto-isovalerato a través de la expresión de genes alsS-ilvCD recombinantes o la expresión de genes ilvHCD recombinantes.

(A) Aldehídos de cadena lineal



(B) Aldehídos de cadena ramificada

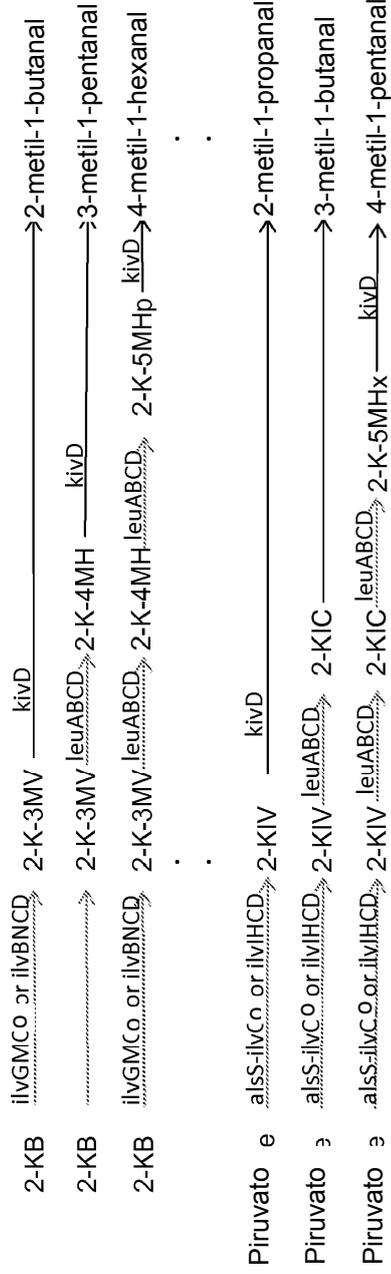


Figura 1 1