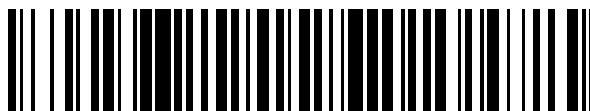


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 728 279**

51 Int. Cl.:

C12N 15/52 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

C12P 7/24 (2006.01)

C12P 7/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.11.2012 PCT/US2012/063288**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.05.2013 WO13067325**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.11.2012 E 12845783 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.03.2019 EP 2773761**

54 Título: **Producción microbiana de n-butiraldehído**

30 Prioridad:

03.11.2011 US 201161555267 P

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

23.10.2019

73 Titular/es:

**EASEL BIOTECHNOLOGIES, LLC (100.0%)
9920 Jefferson Boulevard
Culver City, CA 90232, US**

72 Inventor/es:

**CHO, KWANG MYUNG;
HIGASHIDE, WENDY;
LEE, CHRISSIE y
RABIZADEH, SHAHROOZ**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 728 279 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 microbiana de n-butiraldehído

Esta solicitud reivindica prioridad de la solicitud provisional de EE.UU. pendiente junto con la presente con el número en serie 61/555267, que se presentó el 3 de noviembre de 2011.

5 **Campo de la invención**

El campo de la invención es la producción de productos químicos finos, y en especial la producción microbiana de n-butiraldehído.

Antecedentes de la invención

10 Anualmente se consumen más de 10 millones de toneladas métricas de productos químicos oxo para la síntesis de una amplia variedad de productos industriales y de consumo, que incluyen plastificantes, productos anticongelantes, productos descongelantes para aeronaves y pistas, disolventes, fluidos hidráulicos, pinturas, lubricantes, cosméticos, productos químicos finos, y productos farmacéuticos. En la actualidad, la tecnología predominante para la producción de productos químicos oxo C₃-C₁₅ es la hidroformilación, también conocida como síntesis oxo o proceso oxo. Este proceso químico catalítico implica
15 la adición de un grupo formilo y un átomo de hidrógeno a una olefina (un hidrocarburo con un enlace doble carbono-carbono) en condiciones de temperatura y presión elevadas. Los productos químicos oxo C₄ derivados de propileno representan prácticamente el 73% del consumo mundial de productos químicos oxo. La producción de productos químicos oxo C₄ requiere propileno como material inicial, lo que hace que el proceso no sea sostenible. Los costes de energía sustanciales para el mantenimiento de las condiciones de
20 temperatura y presión elevadas necesarias en el proceso de fabricación actual limitan la eficacia energética global, y por tanto se consideran perjudiciales para el medioambiente.

Por lo tanto, se han desarrollado métodos nuevos para producir productos químicos oxo C₄ mediante el uso de la conversión biológica de fuentes renovables tales como carbohidratos y celulosa, y más recientemente también se han implementado. Entre otras ventajas, se debería indicar que los sustratos derivados de
25 biomasa fijan CO₂ de manera natural, lo que conduce a un proceso de producción de productos químicos oxo neutro en carbono.

Otra aproximación para producir productos químicos oxo implica la ingeniería metabólica de microorganismos para producir productos químicos de interés. Por ejemplo, se pueden cultivar diversas especies de *Clostridium* (sin alteración genética) para producir 1-butanol. Sin embargo, todos o casi todos los procesos
30 conocidos requieren la separación del 1-butanol, y por tanto tienen un elevado coste de recuperación. Se han modificado metabólicamente cepas seleccionadas de *Clostridium* para incrementar la expresión de 1-butanol respecto de otros productos, sin embargo la carencia de herramientas genéticas disponibles para regular las rutas metabólicas de *Clostridium* ha impedido el progreso por esa vía. Para evitar las dificultades asociadas a la ingeniería metabólica de *Clostridium*, se han considerado diversas especies microbianas alternativas que
35 se comprenden mejor y se modifican más fácilmente, que incluyen *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae*, entre otras.

A pesar de las dificultades con *Clostridium*, Kouba et al. enseña en la sol. de pat. de EE.UU. nº 2012/0209021 un método de producción de n-butiraldehído mediante el uso de bacterias solventogénicas recombinantes y microorganismos recombinantes. En ese documento, Kouba et al. describe un método de dos etapas que
40 implica un *Clostridium* recombinante en el que (1) se cultiva la bacteria recombinante y (2) el n-butiraldehído resultante se aísla del medio de cultivo tras la finalización de la fermentación. Aunque tal aproximación es deseable al menos conceptualmente, sin embargo siguen existiendo varias desventajas. Entre otras cosas, el rendimiento de n-butiraldehído del sistema de Kouba es relativamente bajo.

Por tanto, aunque se conocen diversos sistemas y métodos de producción de n-butiraldehído en la técnica,
45 todos o casi todos adolecen de una o más desventajas. Por lo tanto, todavía existe la necesidad de proporcionar sistemas y métodos mejorados para la producción microbiana de n-butiraldehído.

Sumario de la invención

La materia inventiva se refiere a microorganismos, métodos, y sistemas en los que se modifica genéticamente un microorganismo para producir n-butiraldehído. Lo más preferiblemente, tal producción se
50 basa en un rendimiento molar mejorado de acetil-CoA a partir de la conversión metabólica de diversos sacáridos, y especialmente glucosa. El acetil-CoA así producido se condensa después mediante el uso de una secuencia de enzimas (preferiblemente recombinantes), y el producto de condensación se reduce posteriormente a lo largo de múltiples etapas hasta n-butiraldehído. Se prefiere además que se reduzcan o se eliminen una o más alcohol deshidrogenasas microbianas para impedir la degradación adicional de n-
55 butiraldehído.

En aspectos especialmente preferidos adicionales, el n-butiraldehído producido se retira mediante un proceso de inyección de gas mientras se cultiva el microorganismo para conseguir (a) rendimientos acumulativos desconocidos hasta ahora de n-butiraldehído, (b) un RAM₅₀ de 24 horas o menos, (c) una concentración de n-butiraldehído disuelto de 1,0 g/L o menos, y/o (d) un incremento neto de la densidad celular a lo largo de al

5

En un aspecto especialmente preferido, un método de producción de n-butiraldehído incluye una etapa de cultivo de un microorganismo (p.ej., preferiblemente del género *Escherichia* (y especialmente *E. coli*), *Corynebacterium*, *Clostridium*, *Zyomonas*, *Salmonella*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Alcaligenes*, *Klebsiella*, *Paenibacillus*, *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Pichia*, *Candida*, *Hansenula*, *Synechococcus*, *Synechocystis*, *Anabaena*, *Ralstonia*, *Lactococcus*, o *Saccharomyces*) en un medio de cultivo con una fuente de carbono, en el que el microorganismo está modificado para expresar al menos un gen heterólogo y mediante la delección de al menos un gen nativo para permitir la conversión de la fuente de carbono en n-butiraldehído. En otra etapa, el n-butiraldehído producido se recupera del medio de cultivo mediante un proceso de arrastre con gas hasta un rendimiento acumulativo de

10

15

Lo más preferiblemente, el gen heterólogo es una acetil-CoA acetiltransferasa, una 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa, una crotonil-CoA hidratasa, una butiril-CoA deshidrogenasa, una trans-enoil-CoA reductasa, y/o una butanal deshidrogenasa, o el microorganismo está modificado genéticamente para expresar un operón artificial para permitir la expresión de *atoB*, *crt*, *hbd*, y *bl dh*. En general se prefiere además que el microorganismo se modifique genéticamente para que tenga una expresión reducida o suprimida de *ldhA*, *adhE*, *frdBC*, *pta*, y/o *yqhD*.

20

Aunque sin limitarse a la materia inventiva, el proceso de arrastre con gas usa la inyección de un gas de arrastre a una velocidad de inyección de al menos 1 volumen de recipiente por minuto, en el que el tiempo de cultivo es de 24 horas o menos. Se prefiere además que la etapa de recuperación se lleve a cabo a un rendimiento acumulativo de 2,0 g/L en un tiempo de cultivo de 40 horas o menos. Además, se contempla que el n-butiraldehído se puede reducir hasta n-butanol en la fase de vapor, o que el n-butiraldehído se condensa a partir del gas de arrastre y se reduce hasta n-butanol en la fase líquida.

25

Visto desde cierta perspectiva, los inventores también contemplan un método de producción de n-butiraldehído en el que se cultiva un microorganismo en un medio de cultivo con una fuente de carbono, en el que el microorganismo está modificado para expresar al menos un gen heterólogo y mediante delección de al menos un gen nativo, para permitir la conversión de la fuente de carbono en n-butiraldehído. En otra etapa, el n-butiraldehído producido se recupera del medio de cultivo mediante un proceso de arrastre con gas que comprende una etapa de inyección de gas en condiciones eficaces para proporcionar un 50% de rendimiento acumulativo máximo (RAM₅₀) en un tiempo de cultivo de 24 horas o menos, en el que la etapa de recuperación se lleva a cabo durante la etapa de cultivo. Lo más preferiblemente, la etapa de cultivo es un cultivo por lotes a lo largo de al menos 18 horas, y el RAM₅₀ se recupera en 20 horas o menos (p.ej., cuando el RAM₅₀ es al menos 1 g/L).

30

35

Visto desde otra perspectiva, los inventores también contemplan un método de producción de n-butiraldehído en el que se cultiva un microorganismo en un medio de cultivo con una fuente de carbono, en el que el microorganismo está modificado para expresar al menos un gen heterólogo y mediante delección de al menos un gen nativo, para permitir la conversión de la fuente de carbono en n-butiraldehído. En una etapa adicional, el n-butiraldehído producido se recupera del medio de cultivo mediante un proceso de arrastre con gas (p.ej., mediante el uso de inyección continua de gas) a una velocidad de inyección eficaz para mantener el n-butiraldehído disuelto a una concentración por debajo de una concentración umbral de viabilidad, en la que la etapa de recuperación se lleva a cabo durante la etapa de cultivo. Como antes, en general se prefiere que la inyección (continua) de gas sea a una velocidad de inyección de al menos 1 volumen de recipiente por minuto, y/o que la concentración de n-butiraldehído disuelto se mantenga en 1,0 g/L o menos.

40

45

Por lo tanto, los inventores también contemplan un método de producción de n-butiraldehído que incluye una etapa de cultivo de un microorganismo con una fuente de carbono, en la que el microorganismo está modificado para expresar al menos un gen heterólogo y mediante delección de al menos un gen nativo, para permitir la conversión de la fuente de carbono en n-butiraldehído. En una etapa adicional, el n-butiraldehído producido se recupera del caldo de cultivo mediante un proceso de arrastre con gas a una velocidad de inyección de gas eficaz para prevenir una disminución neta de la densidad celular durante hasta al menos 40 horas, en la que la etapa de recuperación se lleva a cabo durante la etapa cultivo. Lo más preferiblemente, la velocidad de inyección de gas es eficaz para producir un incremento neto de la densidad celular a lo largo de al menos 24 horas.

50

55

Diversos objetivos, características, aspectos y ventajas de la materia inventiva serán más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de las realizaciones preferidas, junto con las figuras adjuntas en las que los números similares representan componentes similares.

60

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una representación esquemática de una ruta metabólica modificada ejemplar para la conversión de glucosa en n-butiraldehído.

5 La Figura 2A es un gráfico de barras ejemplar que representa los resultados de la producción de n-butiraldehído (g/L) a partir de glucosa mediante la cepa de *E. coli* metabólicamente modificada EB10 frente a la célula hospedadora EB11.

La Figura 2B es un gráfico de barras ejemplar que representa los resultados de la producción de n-butiraldehído (g/L) a partir de glucosa mediante las cepas de *E. coli* metabólicamente modificadas EB11 frente a EB13.

10 Las Figuras 3A-3C son gráficos de rendimiento que muestran la concentración de n-butiraldehído en el fermentador (medio de cultivo) frente al tiempo y el rendimiento acumulativo de n-butiraldehído (en el gas de inyección) (g/L) frente al tiempo (horas) a velocidades de inyección de gas de 0, 1, y 2 volúmenes de recipiente por minuto (VVM).

15 La Figura 4 es un gráfico que ilustra la toxicidad del n-butiraldehído según una realización de la materia inventiva, representada como unidades formadoras de colonias por microlitro frente al tiempo (horas), a diversas concentraciones de n-butiraldehído.

La Figura 5 es una representación de la densidad celular mediante la DO_{600} , representada como la absorbancia de luz a 600 nanómetros, frente al tiempo (horas) a velocidades de inyección de gas de 0, 1, y 2 VVM.

20 Descripción Detallada

Los inventores han descubierto que se pueden obtener rendimientos incrementados de n-butiraldehído creando o cultivando un microorganismo modificado para producir n-butiraldehído a partir de diversas fuentes de carbono mientras se inyecta gas (preferiblemente inerte) en el fermentador durante la reacción de fermentación.

25 Se debería apreciar que de esta manera no se deja que el producto se acumule y posteriormente se recoja al final del proceso. En su lugar, se usa la inyección de gas durante la fermentación para extraer el n-butiraldehído, lo que inesperadamente pareció incrementar la velocidad de producción, prolongar la viabilidad, y/o la vida productiva de los microorganismos modificados. Por lo tanto, se consiguen rendimientos acumulativos significativamente mayores que con la acumulación del producto en el medio de fermentación.
30 La inyección de gas durante la fermentación puede ser continua o discontinua, a velocidades variables o constantes, en cualquier combinación razonable de las mismas.

Una vez extraído del medio de fermentación, se pueden usar diversos métodos para recuperar el n-butiraldehído, que incluye la captación en disolución, mediante disolución o adsorción en un disolvente, o por medio de adsorción en un adsorbente sólido. El producto así recuperado se puede comercializar después como una materia prima, o se puede convertir en un producto deseable por medio de oxidación, reducción, o condensación.
35

Se debería apreciar además que el microorganismo modificado se puede producir a partir de una diversidad de microorganismos que se modifican para producir n-butiraldehído, que incluyen diversas bacterias, cianobacterias, y hongos. Los microorganismos modificados preferidos también se han modificado para inhibir reacciones posteriores que usan n-butiraldehído como reactivo, y de ese modo además se incrementa el rendimiento del producto de n-butiraldehído. Las fuentes de carbono adecuadas incluyen diversas proteínas, carbohidratos, y lípidos (todos puros o mezclas), y cualquier mezcla sintética o artificial de las mismas (p.ej., extractos celulares, biomasa, biosólidos, etc.).
40

En vista de lo anterior, y en un aspecto preferido de la materia inventiva, en general se contempla que un microorganismo recombinante, y especialmente *E. coli*, exprese un grupo de genes para posibilitar la producción de n-butiraldehído. Más en general, la expresión recombinante incluye la expresión de al menos un gen que codifica un polipéptido que tiene actividad de acetil-CoA acetiltransferasa, la expresión de al menos un gen que codifica un polipéptido que tiene actividad de hidroxibutilil-CoA deshidrogenasa, la expresión de al menos un gen que codifica un polipéptido que tiene actividad de crotonil-CoA hidratasa, la expresión de al menos un gen que codifica un polipéptido que tiene actividad de trans-enoil-CoA reductasa, y/o la expresión de al menos un gen que codifica un polipéptido que tiene actividad de butanal deshidrogenasa. La Figura 1 ilustra una ruta metabólica modificada ejemplar.
45
50

Por lo tanto, se debería apreciar que una célula microbiana modificada comprenderá cualquier combinación de enzimas nativas y heterólogas necesarias para producir n-butiraldehído. Por ejemplo, la célula puede comprender una enzima acetil-CoA acetiltransferasa nativa o heteróloga, una hidroxibutilil-CoA
55

deshidrogenasa nativa o heteróloga, una crotonil-CoA hidratasa nativa o heteróloga, una trans-enoil-CoA reductasa nativa o heteróloga, y/o una butiraldehído deshidrogenasa nativa o heteróloga. De manera más específica, la acetil-CoA acetiltransferasa puede ser cualquier enzima capaz de catalizar la conversión de acetil-CoA en acetoacetil-CoA. En ciertas realizaciones, la acetil-CoA acetiltransferasa tiene un número E.C. de 2.3.1.9. Un gen que codifica una acetil-CoA acetiltransferasa ejemplar es *atoB* de *Escherichia coli* (nºs de GenBank: NP_416728.1. NC_000913.2). De forma similar, la 3-hidroxi-butiril-CoA deshidrogenasa puede ser cualquier enzima capaz de catalizar la conversión de acetoacetil-CoA en 3-hidroxi-butiril-CoA. En ciertas realizaciones, la 3-hidroxi-butiril-CoA deshidrogenasa tiene un número E.C. de 1.1.1.157. Una 3-hidroxi-butiril-CoA deshidrogenasa es *hbd* de *Clostridium acetobutylicum* (nº de GenBank: NP_349314.1. NC_003030.1). La crotonil-CoA hidratasa puede ser cualquier enzima capaz de catalizar la conversión de 3-hidroxi-butiril-CoA en crotonil-CoA. En ciertas realizaciones, la crotonil-CoA hidratasa tiene un número E.C. de 4.2.1.55. Una crotonil-CoA hidratasa ejemplar es *crt* de *Clostridium acetobutylicum* (nºs de GenBank: NP_349318.1. NC_003030.1). La trans-enoil-CoA reductasa puede ser cualquier enzima capaz de catalizar la conversión de crotonil-CoA en butiril-CoA. En ciertas realizaciones, la trans-enoil-CoA reductasa tiene un número E.C. de 1.3.1.38. Una trans-enoil-CoA reductasa ejemplar es *ter* de *Treponema denticola* (nºs de GenBank: NP_971211 NC_002967.9). La butanal deshidrogenasa puede ser cualquier enzima capaz de catalizar la conversión de butiril-CoA en butiraldehído. En ciertas realizaciones, la butanal deshidrogenasa tiene un número E.C. de 1.2.1.57. Una butanal deshidrogenasa ejemplar es *bldh* de *Clostridium saccharoperbutylacetonicum NI-4*.

En otras realizaciones preferidas, se debería apreciar que se pueden expresar genes que no participan directamente en la producción de n-butiraldehído para incrementar la producción/título de n-butiraldehído para alcanzar un equilibrio favorable en una reacción en equilibrio. Por ejemplo, la célula puede comprender una formiato deshidrogenasa nativa o heteróloga para proporcionar una fuerza de control metabólico para la ruta de producción de n-butiraldehído. La producción y pérdida posterior de CO₂ impide la reacción reversible. La formiato deshidrogenasa puede ser cualquier enzima capaz de catalizar la conversión de formiato en CO₂. En ciertas realizaciones, la formiato deshidrogenasa tiene un número E.C. de 1.2.1.2. Un gen que codifica una formiato deshidrogenasa ejemplar es *fdh* de *Candida boidinii* (nºs de GenBank: AF004096, AJ245934, AJ011046, DQ458777). Se describen modificaciones y líneas celulares adecuadas adicionales en los documentos WO 2012/125688A2, EP2084287B1, US8188250B2, US20110281314A1, US20120064590A1, WO2012004460A2, WO2012045022A2, WO2012061653A2, WO2012061653A9, WO2012099934A2, WO2012109176A2, y WO2012125688A2.

Por lo tanto, se debería indicar que la producción de alcohol en las células contempladas se reducirá significativamente en comparación con las células correspondientes sin modificar. Preferiblemente, la producción de alcohol se reduce en alrededor del 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, o más de alrededor del 95% en masa o volumen en comparación con el producido en una célula de control sin modificar. Más preferiblemente, la producción de alcohol se reduce en alrededor del 99%, y lo más preferiblemente, las células hospedadoras recombinantes contempladas no producen alcohol detectable. En ciertas realizaciones, uno o más genes de alcohol deshidrogenasa se inactivan o se inhabilitan de otra manera. Más preferiblemente, todos los genes de alcohol deshidrogenasa se inactivan o se inhabilitan de otra manera.

Con respecto a la célula microbiana, se debería apreciar que el organismo particular no es crítico para la materia inventiva, con tal de que en tal microorganismo se pueda dar la modificación recombinante y la producción de n-butiraldehído. Por lo tanto, los organismos adecuados incluyen diversas bacterias, cianobacterias, u hongos. Por ejemplo, el microorganismo en ciertas realizaciones puede pertenecer a un género seleccionado del grupo que consiste en *Escherichia*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Alcaligenus*, *Zymomonas*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Synechococcus*, *Synechocystis*, *Saccharomyces*, *Pichia*, *Candida*, *Hansenula*, y *Aspergillus*. En las realizaciones especialmente preferidas, el microorganismo es *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Synechococcus elongatus*, *Ralstonia eutropha*, o *Saccharomyces cerevisiae*.

El microorganismo recombinante se puede preparar mediante el uso de cualquier método conocido para alguien de experiencia habitual en la técnica, y se entenderá que las modificaciones pueden incluir la inserción o delección de uno o más genes, tal como se considere necesario para incrementar o disminuir la actividad de una ruta enzimática particular. En ciertas realizaciones, también se puede usar un microorganismo mutante en los métodos de la presente invención, y se puede modificar adicionalmente de manera recombinante como se desee. Así, las modificaciones adecuadas incluirán la mutagénesis aleatoria para producir patrones de expresión deficientes, ácidos nucleicos extracromosómicos (en general plásmidos o fagémidos) con elementos de control adecuados para producir una sobreexpresión controlada de una o más enzimas, inserciones genómicas con elementos de control adecuados para producir una sobreexpresión controlada de una o más enzimas, etc.

Con respecto a la producción real de n-butiraldehído, se contempla, por lo tanto, que los métodos adecuados incluyen la fermentación de un microorganismo modificado como se describe en la presente memoria en condiciones que permiten que el microorganismo use una fuente de carbono para producir de ese modo n-butiraldehído. El n-butiraldehído así producido se recupera y se purifica al mismo tiempo mediante el uso de

métodos de arrastre con gas muy conocidos (p.ej., inyección de un gas inerte a través del medio de cultivo), y posteriormente se purifica mediante el uso de métodos muy conocidos (p.ej., condensación). Más en general, la concentración [gramo/litro] del n-butiraldehído producido en el microorganismo es sustancialmente mayor que la concentración [gramo/litro] del alcohol producido en el microorganismo. Por ejemplo, la proporción de la concentración de n-butiraldehído en comparación con la concentración de alcohol es al menos 80:20. Más preferiblemente, la proporción es 90:10, 95:5, o 99:1.

La fuente de carbono puede ser cualquier fuente de carbono adecuada apropiada para el microorganismo seleccionado, tal como glucosa, fructosa, sacarosa, almidón, celulosa, hemicelulosas, glicerol, dióxido de carbono, proteínas, y/o aminoácidos. También se puede usar cualquier combinación de las anteriores fuentes de carbono y/u otras fuentes de carbono adecuadas. La persona de experiencia habitual en la técnica podrá seleccionar fácilmente la fuente de carbono adecuada basándose en el tipo de organismo microbiano seleccionado. Sin embargo, las fuentes de carbono especialmente preferidas incluyen las que son neutras en carbono. Así, y entre otras elecciones adecuadas, las fuentes de carbono incluirán diversos hidrolizados (hemicelulósicos, proteicos, etc.) y carbohidratos en bruto.

15 Ejemplos

El siguiente ejemplo demuestra la producción de n-butiraldehído a partir de glucosa mediante una cepa de *E. coli* modificada que tiene los genes *ldhA*, *adhE*, *frdBC*, y *yqhD* inactivados, pero que contiene los genes *atoB-hbd-crt-ter-blh-fdh*. La cepa hospedadora así modificada para la producción de n-butiraldehído, la cepa de *E. coli* EB10, es un derivado BW25113 de *E. coli* (*rrnBT14 ΔlacZWWJ16 hsdR514 ΔaraBADAH33 ΔrhaBADLD78*) con F' transducido a partir de XL-1 Blue para proporcionar *lacIq* e inactivaciones génicas en los genes *ldhA*, *adhE*, *frdBC*, e *yqhD*. La cepa se optimizó además con una delección de *pta* adicional en EB10, que dio como resultado EB12.

Así, las cepas se pueden caracterizar como sigue: EB10: BW25113 con inactivaciones génicas en *ldhA*, *adhE*, *frdBC*, y *yqhD*. EB11: BW25113 con inactivaciones génicas en: *ldhA*, *adhE*, *frdBC*, e *yqhD* (pEB73, pIM8, pCS138). EB12: BW25113 con inactivaciones génicas en: *ldhA*, *adhE*, *frdBC*, *yqhD* y *pta*. EB13: BW25113 con inactivaciones génicas en: *ldhA*, *adhE*, *frdBC*, *yqhD* y *pta* (pEB73, pIM8, pCS138).

Para este ejemplo particular, se construyeron tres plásmidos y se usaron para la producción de n-butiraldehído. El primer plásmido tiene un operón artificial construido para la sobreexpresión de los genes *atoB-crt-hbd-blh* con un promotor λP_L y una secuencia operadora *lac*. El segundo plásmido tiene un gen *ter* con un promotor λP_L y una secuencia operadora *lac*. El tercer plásmido tiene un gen *fdh* con un promotor λP_L y una secuencia operadora *lac*. Las células EB10 y EB12 se transforman para contener los tres plásmidos para formar EB11 y EB13, respectivamente. Las cepas de producción de n-butiraldehído modificadas resultantes se denominaron *E. coli* EB11 y EB13, respectivamente. Las cepas de *E. coli* EB10 y EB11 se pre-cultivaron en tubos de ensayo que contuvieron 3 ml de medio LB a 37 °C durante la noche en un agitador rotatorio (250 r.p.m.) con ampicilina (100 µg/ml), kanamicina (50 µg/ml), y cloranfenicol (25 µg/ml), cuando fue necesario. Los cultivos de la noche se diluyeron 1:100 en 5 ml de medio fresco con los mismos antibióticos. El medio fresco es Terrific Broth (TB) (12 g de triptona, 24 g de extracto de levadura, 2,31 g de KH_2PO_4 , 12,54 g de K_2HPO_4 , 4 ml de glicerol por litro de agua) complementado con un 2% de glucosa. Las células se cultivaron hasta una DO_{600} de 0,4 a 0,6 y después se indujeron con isopropil- β -D-tiogalactósido (IPTG) 0,1 mM durante otras 1 a 2 h en condiciones aerobias a 37 °C durante la noche en un agitador rotatorio (250 r.p.m.). Los cultivos se transfirieron de los tubos de ensayo a tubos sellados BD Vacutainer de 10 ml. El oxígeno se evacuó y se sustituyó con gas N_2 . Se dejó desarrollar la fermentación durante 24 horas a 37 °C durante la noche en un agitador rotatorio (250 r.p.m.).

Producción en biorreactor de n-butiraldehído: Se usó la cepa EB12 en la fermentación para la producción en biorreactor de n-butiraldehído. El pre-cultivo de la noche se inoculó en LB que contuvo los antibióticos adecuados y se dejó desarrollar a 37 °C en un agitador rotatorio a 250 rpm. La fermentación de n-butiraldehído se llevó a cabo en un biorreactor de tanque agitado de 5 litros (Eppendorf, Hauppauge, NY, EE.UU.), mediante el uso de un volumen de trabajo de 2,0 litros. El biorreactor se inoculó con 23 ml del pre-cultivo de la noche, y se añadió IPTG 0,1 mM en el momento de la inoculación para inducir la expresión de las enzimas implicadas en la ruta de producción de n-butiraldehído. El oxígeno disuelto (OD) durante la etapa aerobia se mantuvo al 20% con respecto a la saturación de aire elevando la velocidad del agitador (de 200 rpm a 500 rpm). Las células se cultivaron a 30 °C en condiciones aerobias en modo por lotes hasta que la densidad óptica alcanzó aproximadamente $DO_{600} = 0,8$. Después, la agitación se ajustó a 350 rpm y se hizo burbujear el vvm especificado (volumen de gas por volumen de líquido por minuto) de nitrógeno a través del biorreactor con dos objetivos: (i) cambiar a condiciones anaerobias y (ii) llevar a cabo el arrastre con gas *in situ* de n-butiraldehído. Tras el cambio anaerobio, se inició una alimentación lineal intermitente de disolución de glucosa (500 g/litro) para mantener una concentración de glucosa entre 10 y 20 g/L. El n-butiraldehído evaporado se condensó mediante el uso de un condensador de Graham y después se hizo pasar a través de una serie de tres trampas llenas de agua (4 °C). El pH se controló a 6,8 en todo momento mediante la adición automática de una disolución de NaOH 5 M. En los puntos temporales especificados, se recogieron muestras de fermentación para determinar el crecimiento celular, la producción de n-butiraldehído, y la concentración

de glucosa, y se sustituyó el agua de las trampas. Los compuestos alcohólicos producidos por las cepas analizadas se identificaron mediante GC-MS. El sistema incluyó un sistema de GC modelo 6890N Network (Agilent Technologies), un inyector modelo 7883B y un automuestreador (Agilent Technologies) y un detector selectivo de masas modelo 5973 Network (Agilent Technologies). Se usó una columna capilar DB-5ms (30 m, diámetro interno 0,25 mm, grosor de película 0,25 μm ; Agilent Technologies), con helio ($1 \text{ ml}/\text{min}^{-1}$) como gas portador. Se programa una temperatura del horno de $75 \text{ }^\circ\text{C}$ (2,6 min) a $200 \text{ }^\circ\text{C}$ a $30 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}^{-1}$. El inyector y el detector se mantienen a $250 \text{ }^\circ\text{C}$. Se aíslan los compuestos alcohólicos mediante extracción con disolvente. Se extraen trescientos microlitros de sobrenadante del caldo de cultivo tras la centrifugación con $150 \mu\text{l}$ de tolueno de grado estándar de GC (Fluka). Se inyecta una muestra de $1 \mu\text{l}$ en modo de inyección con división con una proporción de división 30:1.

Los compuestos alcohólicos producidos se cuantificaron mediante un cromatógrafo de gases equipado con un detector de ionización de llama. El sistema fue un cromatógrafo de gases modelo 7890A (Agilent Technologies) y un automuestreador modelo 7693 (Agilent Technologies). La separación de los compuestos alcohólicos se lleva a cabo mediante una columna capilar DB-FFAP (30 m, diámetro interno 0,32 mm, grosor de película 0,25 μm ; Agilent Technologies). La temperatura del horno de GC se mantuvo inicialmente a $85 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 2 min y se elevó con un gradiente de $45 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ hasta $235 \text{ }^\circ\text{C}$, y se mantuvo durante 3 min. Se usó helio como gas portador con una presión de entrada de $96,5 \text{ kPa}$ (14 psi). El inyector y el detector se mantuvieron a $225 \text{ }^\circ\text{C}$. Se inyectó una muestra de $1 \mu\text{l}$ en una proporción de división 25:1. Se usa 1-pentanol como patrón interno. Los resultados ejemplares que comparan EB10 con la cepa de producción EB11 se muestran en la Figura 2A, y el efecto de mutación de inactivación génica adicional en *pta* en la cepa de producción EB13 (respecto de la cepa de producción EB11) se muestra en la Figura 2B. Como es fácilmente evidente, se puede producir n-butiraldehído ($227 \text{ mg}/\text{L}$) a partir del caldo que contiene la cepa modificada EB11, pero no en el caldo que contiene EB10 solamente. Además, es fácilmente evidente que se incrementaron de manera inesperada y significativa los niveles de producción mediante la delección de *pta* (fosfotransacetilasa o fosfato acetiltransferasa).

Las Figuras 3A-3C muestran la concentración de n-butiraldehído producida en el fermentador frente al tiempo de cultivo mediante el uso de EB13 y el rendimiento acumulativo de n-butiraldehído frente al tiempo de cultivo a velocidades de inyección de gas de 0, 1, y 2 VVM. Con respecto a la Figura 3A, no se está inyectando gas (0 VVM). La concentración de n-butiraldehído alcanza un máximo de alrededor de $0,20\text{-}0,25 \text{ g}/\text{L}$ en el fermentador tras alrededor de 20 horas, después disminuye hasta que alcanza cero en alrededor de 40 horas. En las Figuras 3B-3C, las velocidades de inyección de gas son 1 y 2 VVM, respectivamente, y la concentración máxima de n-butiraldehído presente en el fermentador es aproximadamente la misma que sin inyección de gas, es decir, alrededor de $0,20\text{-}0,25 \text{ g}/\text{L}$ en 20 horas o menos. Los resultados descritos en los ejemplos y mostrados en la Figura 2 son coherentes con esta observación; se recuperaron $0,227 \text{ g}/\text{L}$ de n-butiraldehído tras un tiempo de cultivo de 24 horas.

Con respecto de nuevo a las Figuras 3B-3C, sin embargo, el rendimiento acumulativo de n-butiraldehído se incrementa significativamente mediante la inyección de gas durante la fermentación. A una velocidad de inyección de gas de 1 VVM, por ejemplo, el rendimiento acumulativo total es mayor que la concentración máxima aparente sin inyección de gas. En este ejemplo, el producto se recoge con inyección de gas a lo largo de alrededor de 90 horas, y el rendimiento total es de aproximadamente $1,9 \text{ g}/\text{L}$. A una velocidad de inyección de gas de 2 VVM, el producto se recoge a lo largo de la misma cantidad de tiempo, pero con un rendimiento acumulativo máximo (RAM) de aproximadamente $2,25 \text{ g}/\text{L}$.

Esta concentración máxima aparente de $0,20\text{-}0,25 \text{ g}/\text{L}$ en el medio de fermentación es algo sorprendente. La solubilidad de n-butiraldehído en agua es aproximadamente de $70 \text{ g}/\text{L}$, de forma que se podía esperar razonablemente que el n-butiraldehído máximo en el fermentador se incrementara de manera lineal hasta un máximo sustancialmente mayor. También sorprendentemente, cuando se inyecta un gas inerte a través del medio de cultivo, se extraen cantidades significativas de n-butiraldehído a pesar de su elevada solubilidad. Así, se puede conseguir un rendimiento deseable con una masa elevada mediante una inyección de gas adecuada. Con respecto a la Figura 3C en particular, se debería apreciar que la mitad del rendimiento acumulativo máximo (RAM₅₀) se adquiere aproximadamente a las 20 horas, que es aproximadamente el mismo tiempo en el que se alcanza la concentración máxima de n-butiraldehído en el fermentador. Así, la inyección de gas concurrente a 2 VVM da como resultado aproximadamente cinco veces el producto en el mismo tiempo, y otras cinco veces el producto recogido a lo largo de aproximadamente las 70 horas siguientes.

Volviendo a la Figura 4, se muestra el número de unidades formadoras de colonias por μL de *E. coli* modificada en función del tiempo tras la adición de diversas concentraciones de n-butiraldehído (NBAL) (ensayo de incubación) en un tubo sellado para prevenir la evaporación del n-butiraldehído. En todos los casos, que incluyen el caso en el que no se realiza ninguna adición, el número de unidades formadoras de colonias tiende a un valor mínimo (p.ej., células que ya no son viables) después de alrededor de 24 horas. Para una concentración de $1,0 \text{ g}/\text{L}$, el gráfico muestra un incremento neto de las unidades formadoras de colonias un poco después de 5 horas, pero las concentraciones de $1,2 \text{ g}/\text{L}$ y superiores muestran una disminución neta incluso a las 4,5 horas. Estos datos sugieren que existe una concentración umbral de

viabilidad de n-butiraldehído a la que hay una producción máxima de n-butiraldehído y un tiempo de viabilidad máximo para las células. El rendimiento incrementado de n-butiraldehído conseguido mediante el uso de un método de inyección de gas concurrente según la presente invención parece ser coherente con el análisis de la viabilidad.

5 La Figura 5 es una representación de la densidad celular mediante la DO_{600} , representada como la absorbancia a 600 nm, frente al tiempo (horas) a velocidades de inyección de gas de 0, 1, y 2 VVM. En cada caso, los datos muestran un incremento de la densidad celular en la hora 15. A las 24 horas, sin embargo, la muestra de inyección de gas de 0 VVM muestra una disminución notable de la densidad celular, mientras las muestras de 1 y 2 VVM continúan mostrando incrementos de la densidad celular. A aproximadamente 40
10 horas, las muestras de 1 y 2 VVM continúan mostrando un incremento neto, y después de 89 horas, la muestra de 1 VVM muestra una disminución neta, pero la muestra de 2 VVM continúa mostrando un incremento neto.

Los datos de la densidad celular parecen ser coherentes con el análisis de la viabilidad y los datos de rendimiento. En particular, el RAM_{50} a las 24 horas parece ser coherente con las células viables que están produciendo activamente n-butiraldehído a una velocidad máxima. Después de 24 horas, la producción de n-butiraldehído continúa a una velocidad reducida hasta que se alcanza un rendimiento máximo.

Evidentemente, la inyección de gas durante la producción de n-butiraldehído proporciona rendimientos significativamente incrementados de n-butiraldehído. Sin desear limitarse a cualquier método o mecanismo particular, los inventores suponen que el producto de n-butiraldehído inhibe su producción continuada por encima de un rendimiento mínimo. Este rendimiento mínimo, que es aproximadamente igual a la concentración máxima de n-butiraldehído en el sistema sin inyección de gas, es significativamente inferior a lo que se esperaría al considerar la solubilidad de n-butiraldehído.

Con respecto a evitar la inhibición de la producción de n-butiraldehído, por tanto se contemplan diversas aproximaciones. Debido a que los datos parecen mostrar que el RAM se incrementa con las velocidades incrementadas de inyección de gas, sería razonable concluir que las velocidades de inyección de gas mayores de 2 VVM producirían incrementos mayores en el RAM. Por tanto, se consideran adecuadas las velocidades de inyección de gas de al menos 2,0 VVM, más en general al menos 2,5 VVM, y lo más en general al menos 3,0 VVM.

Otra aproximación es reconocer que si el producto de n-butiraldehído se disuelve en la fase líquida cuando se produce, cuando se da la inyección de gas, es la interfase gas-líquido donde se puede extraer el producto. Si se incrementa la proporción de superficie gas-líquido de esta interfase, se puede esperar un incremento de la cantidad de producto extraído. Un incremento de la velocidad de inyección de gas (y/o una configuración diferente del inyector) proporcionaría burbujas más pequeñas, lo que incrementaría la proporción de superficie gas-líquido. De forma similar, el incremento de la velocidad del impulsor rompería las burbujas de gas, produciendo también una proporción incrementada de superficie gas-líquido. Cualquier combinación de estos métodos debería producir un incremento de la cantidad de producto, su velocidad de producción, o ambas.

Más allá de la simple modificación del proceso de inyección de gas, los datos sugieren otras soluciones potenciales para incrementar el RAM de n-butiraldehído. Con respecto a microorganismos tales como *E. coli* modificada, las variaciones de la temperatura pueden afectar a las velocidades de producción. La disminución de la temperatura en el fermentador probablemente daría como resultado más producto génico recombinante, aunque a una velocidad inferior. Presumiblemente, existe una velocidad de inyección de gas óptima asociada a una temperatura del fermentador determinada para conseguir rendimientos máximos. A la inversa, se podría incrementar la temperatura a niveles en o cerca del punto de ebullición de n-butiraldehído, y se podrían elegir microorganismos metabólicamente modificados que crecerían en estas condiciones. Esto sería más parecido a una reacción de destilación, en la que el n-butiraldehído se produciría en o cerca de la fase de vapor y se extraería de la disolución. Esto también podría ayudar a mantener una concentración baja de producto en el fermentador, lo que disminuiría los efectos tóxicos potenciales indicados anteriormente. Dependiendo de la temperatura del sistema, la inyección de gas a una velocidad adecuada también podría ayudar a extraer el producto.

Se podría variar la presión del sistema, con un protocolo de inyección de gas adecuado. Por ejemplo, se podría disminuir la presión en el recipiente, lo que incrementaría la liberación de n-butiraldehído. También se podría reducir la presión del gas de inyección, o se podría usar un proceso de inyección de gas intermitente, o una combinación de estos métodos para proporcionar un RAM óptimo.

55 Estos ejemplos utilizaron un método de fermentación por lotes. También se podría prever en su lugar el uso de un método de fermentación continuo, en el que se introduce líquido fresco (medio de cultivo) en el reactor a la misma velocidad que se extrae el medio gastado del fermentador, mientras se inyecta gas en el reactor. En este ejemplo, el medio gastado contiene tanto el producto como células del microorganismo. El producto se recoge después del propio fermentador, y al medio gastado se le puede inyectar gas de nuevo para

obtener cualquier cantidad residual de producto. Por lo tanto, se podrían mantener las concentraciones del producto en el medio por debajo de una concentración umbral de viabilidad.

5 Se puede modificar el diseño del propio fermentador para posibilitar la recogida del producto de una manera diferente. Por ejemplo, se podría emplear un fermentador de película fina o un fermentador de fibra hueca, que proporciona el producto en el medio, en el que después se podría inyectar gas para retirar el producto. De manera alternativa, los microorganismos modificados se podrían inmovilizar en un medio de tipo gel o alginato (véase p.ej. el documento WO2012/004460), y el medio de cultivo se podría hacer pasar continuamente a lo largo o a través del medio que contiene los microorganismos y exponerlo a la inyección de gas inmediatamente después. Esto minimizaría la exposición de los microorganismos modificados a 10 concentraciones incrementadas de producto, ya que el producto continuaría fluyendo más allá de los microorganismos con el medio de cultivo, y se extraería prácticamente inmediatamente. De manera alternativa, la fase líquida que contiene el producto se podría alimentar en otro recipiente que estuviese experimentando el proceso de inyección de gas a medida que progresa la fermentación.

15 Además, se contempla que los propios medios de cultivo se puedan ampliar con un componente que adsorba n-butiraldehído, tal como tamices moleculares, o un líquido de reparto inmiscible con el agua que disuelve preferentemente n-butiraldehído. Esto tendría el efecto de retirar el n-butiraldehído de los microorganismos, de acuerdo con el concepto de que la extracción de n-butiraldehído del medio de cultivo incrementaría su RAM.

REIVINDICACIONES

1. Un método de producción de n-butiraldehído, que comprende:
- 5 (a) cultivar un microorganismo en un medio de cultivo con una fuente de carbono, en el que el microorganismo está modificado para expresar al menos un gen heterólogo y mediante delección de al menos un gen nativo para permitir la conversión de la fuente de carbono en n-butiraldehído;
- 10 en el que el al menos un gen heterólogo se selecciona del grupo que consiste en una acetil-CoA acetiltransferasa, una 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa, una crotonil-CoA hidratasa, una butiril-CoA deshidrogenasa, una trans-enoil-CoA reductasa, y una butanal deshidrogenasa, o en el que el microorganismo está modificado genéticamente para expresar un operón artificial para permitir la expresión de atoB, crt, hbd, y bldh;
- 15 en el que el microorganismo está modificado genéticamente para tener una expresión reducida o suprimida de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en ldhA, adhE, frdBC, pta, e yqhD;
- en el que el microorganismo pertenece a un género seleccionado del grupo que consiste en Escherichia, Corynebacterium, Clostridium, Zymomonas, Salmonella, Rhodococcus, Pseudomonas, Bacillus, Lactobacillus, Enterococcus, Alcaligenes, Klebsiella, Paenibacillus, Arthrobacter, Brevibacterium, Pichia, Candida, Hansenula, Synechococcus, Synechocystis, Anabaena, Ralstonia, Lactococcus y Saccharomyces; y
- (b) recuperar el n-butiraldehído producido del medio de cultivo mediante un proceso de arrastre con gas con un rendimiento acumulativo de n-butiraldehído de al menos 1,5 g/L;
- 20 en el que la etapa de recuperación se lleva a cabo durante la etapa de cultivo.
2. El método de la reivindicación 1, en el que el proceso de arrastre con gas comprende la inyección de un gas de arrastre a una velocidad de inyección de al menos 1 volumen de recipiente por minuto, y en el que el tiempo de cultivo es de 24 horas o menos.
3. El método de la reivindicación 1, en el que la etapa de recuperación se lleva a cabo con un rendimiento acumulativo de 2,0 g/L en un tiempo de cultivo de 40 horas o menos.
- 25 4. Un método de producción de n-butanol que comprende el método de la reivindicación 1, en el que el microorganismo es E. coli, y dicho método comprende además una etapa de reducción de n-butiraldehído hasta n-butanol en fase de vapor.
5. Un método de producción de n-butanol que comprende el método de la reivindicación 1, que comprende además una etapa de condensación de n-butiraldehído y reducción del n-butiraldehído hasta n-butanol en fase líquida.
- 30 6. El método de la reivindicación 1, en el que el proceso de arrastre con gas comprende una etapa de inyección de gas en condiciones eficaces para proporcionar un 50% de un rendimiento acumulativo máximo (RAM50) en un tiempo de cultivo de 24 horas o menos.
7. El método de la reivindicación 1, en el que el proceso de arrastre con gas usa una velocidad de inyección de gas eficaz para mantener disuelto el butiraldehído a una concentración menor de una concentración umbral de viabilidad.
- 35 8. El método de la reivindicación 1, en el que el proceso de arrastre con gas usa una velocidad de inyección de gas eficaz para prevenir una disminución neta de la densidad celular durante hasta al menos 40 horas, y en el que la velocidad de inyección de gas preferiblemente es eficaz para producir un incremento neto de la densidad celular a lo largo de al menos 24 horas.
- 40

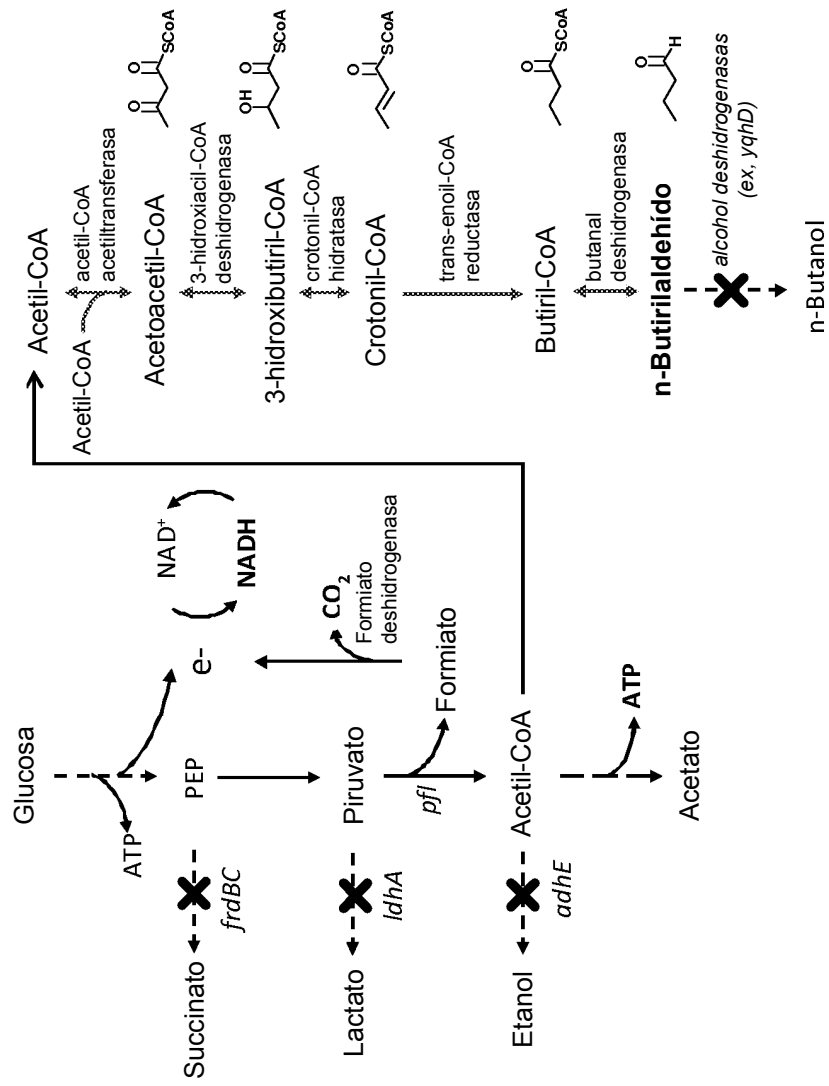


Figura 1

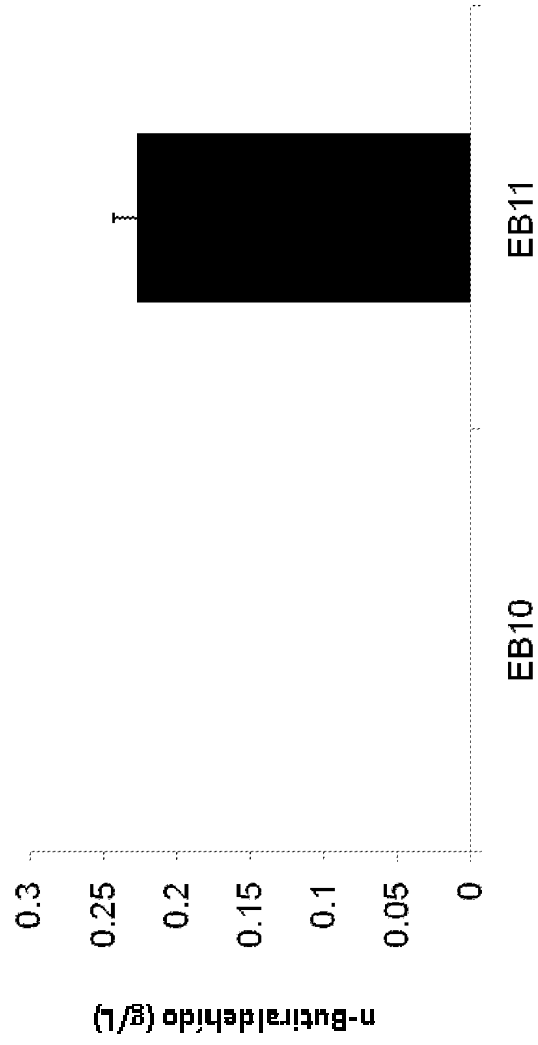


Figura 2A

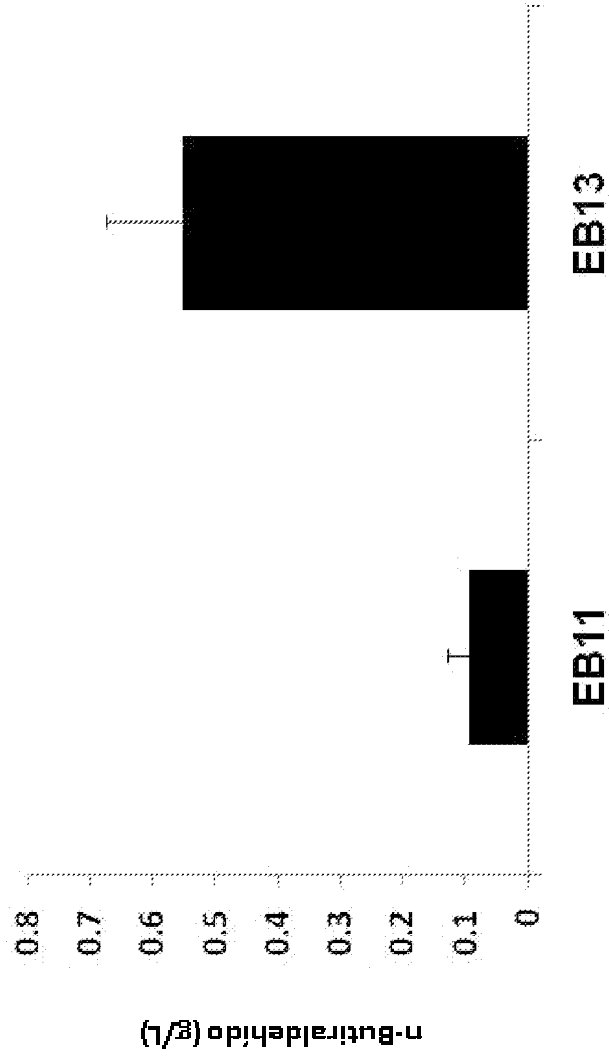


Figura 2B

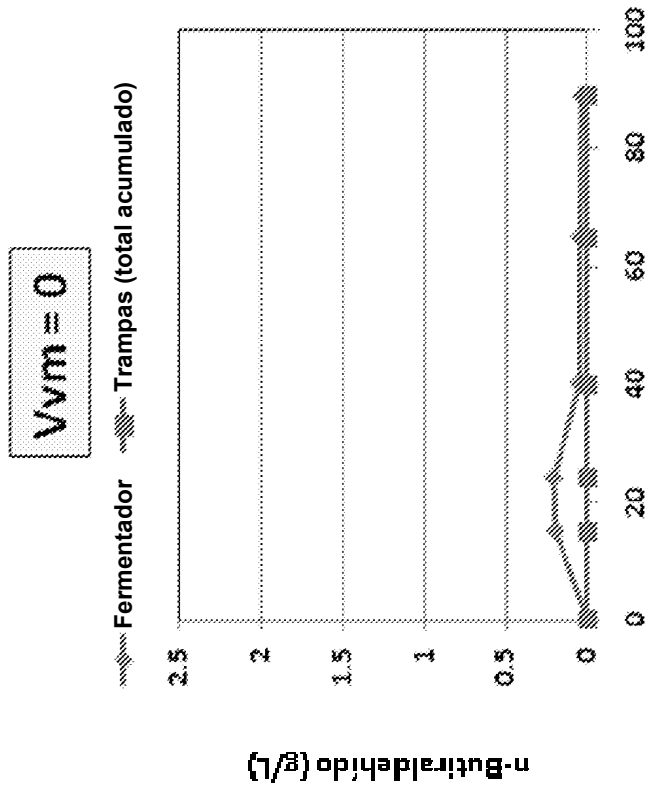


Figura 3A

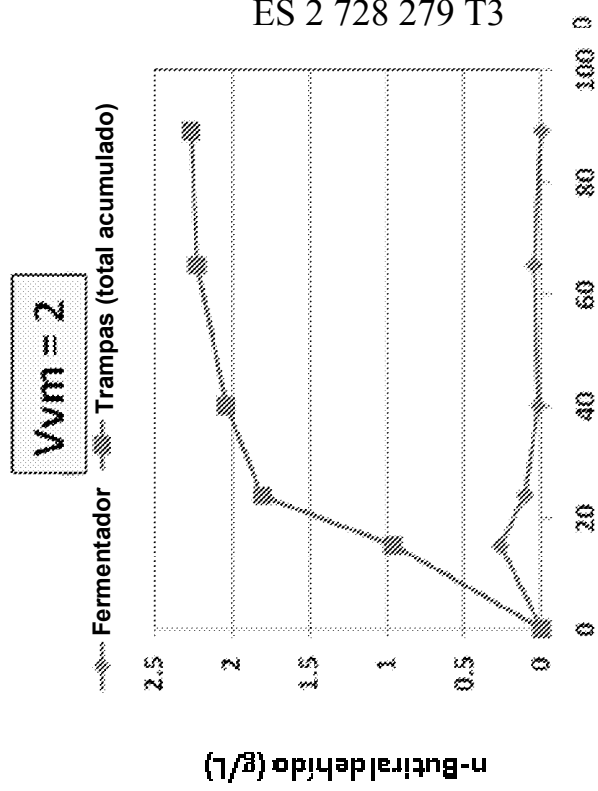


Figura 3C

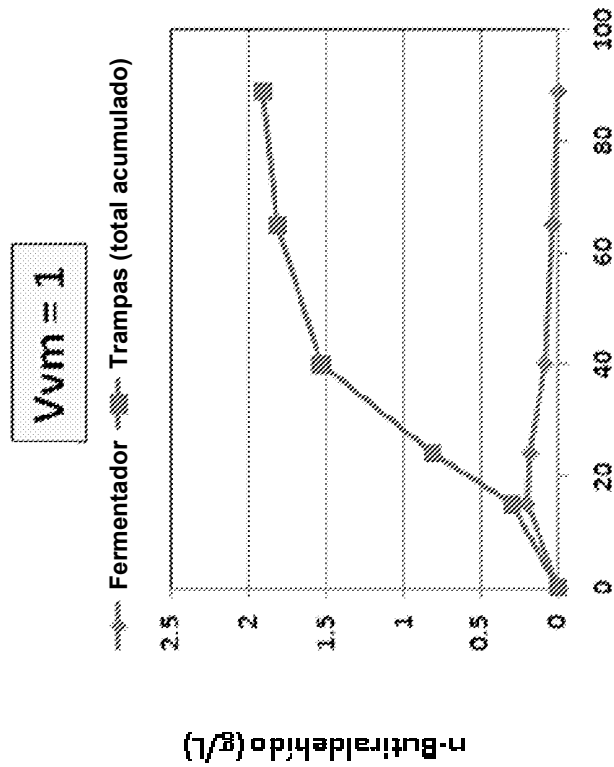


Figura 3B

ES 2 728 279 T3

0.0 g/L 1.0 g/L 1.2 g/L 1.4 g/L 1.6 g/L 1.8 g/L 2.0 g/L

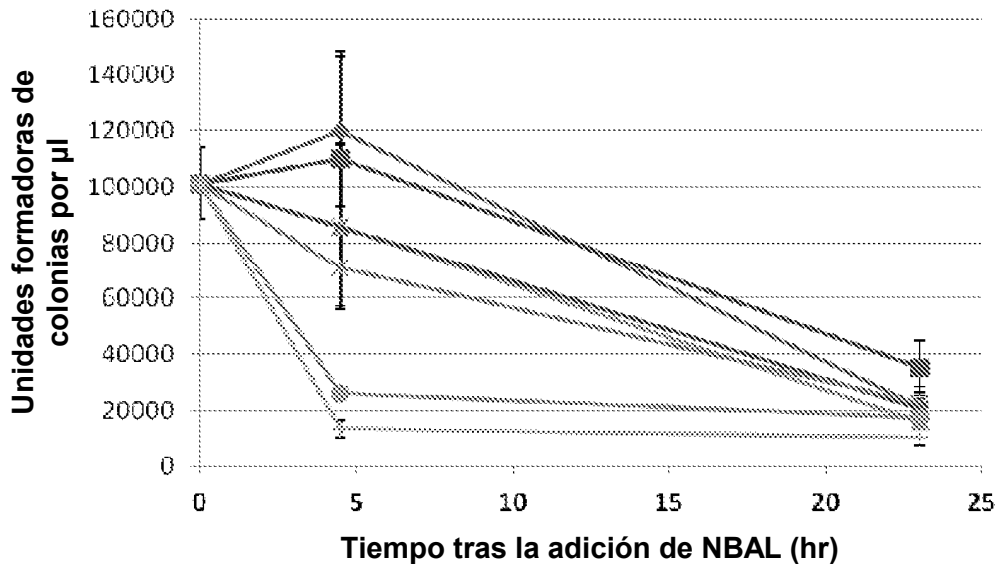


Figura 4

0 VVM 1 VVM 2 VVM

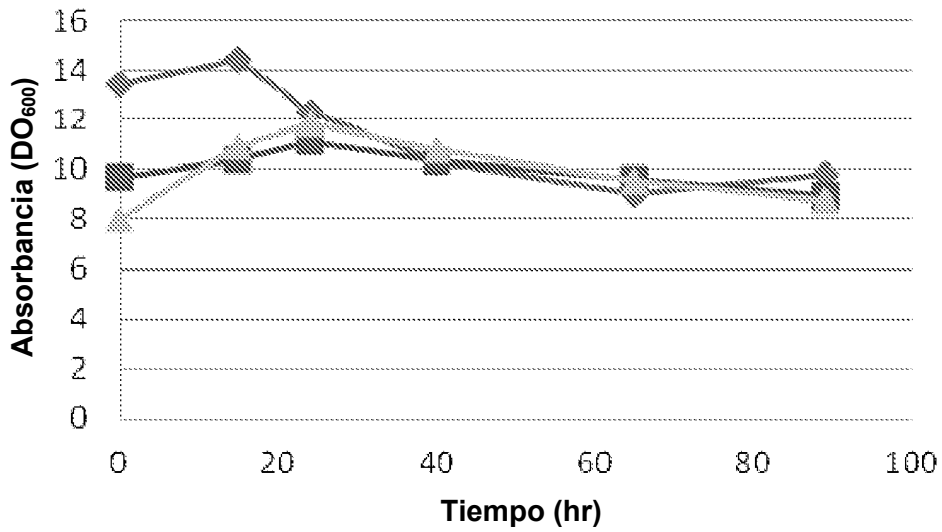


Figura 5