(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 201691383 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2017.01.30

(22) Дата подачи заявки
2015.01.29

(51) Int. Cl. ***C12N 1/21*** (2006.01)
C12N 9/02 (2006.01)

(54) РЕКОМБИНАНТНЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

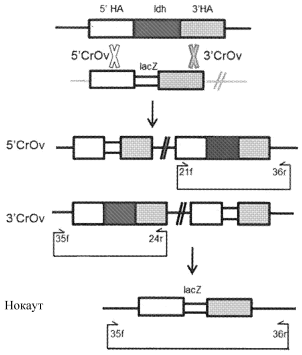
(31) **61/933,815; 61/944,541**
(32) **2014.01.30; 2014.02.25**
(33) **US**
(86) **PCT/US2015/013625**
(87) **WO 2015/116874 2015.08.06**

(71) Заявитель:
ЛАНЦАТЕК НЬЮ ЗИЛЭНД ЛИМИТЕД (NZ)

(72) Изобретатель:
Нагараджу Шилпа, Ал-Синави Бакир, Де Тиссера Сашини, Кёпке Михель (US)

(74) Представитель:
Осипов К.В., Ильмер Е.Г., Пантелеев А.С., Хмара М.В., Дощечкина В.В., Новоселова С.В., Липатова И.И. (RU)

(57) В изобретении предложена карбокситрофная ацетогенная бактерия, содержащая нарушающую мутацию в ферменте пути биосинтеза лактата и способ получения продукта путем культивирования бактерии в присутствии субстрата, содержащего монооксид углерода. Предпочтительно фермент пути биосинтеза лактата представляет собой лактатдегидрогеназу (ЛДГ) или другой фермент, который преобразует пируват в лактат, при этом указанная нарушающая мутация уменьшает или устраняет экспрессию или активность указанного фермента таким образом, что указанная бактерия продуцирует уменьшенное количество лактата или не продуцирует лактат.



201691383 A1

201691383 A1

РЕКОМБИНАНТНЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[001] Настоящая заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке на патент США 61/933815, поданной 30 января 2014 г, и предварительной заявке на патент США 61/944541, поданной 25 февраля 2014 г, которые в полном объеме включены в настоящий документ посредством ссылки.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[002] Настоящая заявка содержит перечень последовательностей нуклеотидов/аминокислот, предоставленный одновременно с настоящей заявкой и определенный следующим образом: файл 23322 байт ASCII (текст) с названием “LT102WO1_ST25.txt”, созданный 29 января 2015 года, который в полном объеме включен в настоящий документ посредством ссылки.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[003] Ацетоген представляет собой микроорганизм, который вырабатывает или способен вырабатывать ацетат в качестве продукта анаэробного дыхания. Как правило, ацетогенами являются облигатно анаэробные бактерии, которые используют метаболический путь Вуда-Льюнгдаля в качестве основного механизма для сохранения энергии и для синтеза ацетил-КоА и продуктов-производных ацетил-КоА, таких как ацетат и этанол (Ragsdale, *Biochim Biophys Acta*, 1784: 1873-1898, 2008).

[004] Многие ацетогены естественным образом продуцируют по меньшей мере два или более продуктов. Однако, это не всегда является желательным в промышленном масштабе, так как получение нескольких продуктов отрицательно сказывается на эффективности и выходе каждого отдельного продукта. В частности, побочные продукты могут изымать углерод из путей биосинтеза целевого продукта, привносить проблемы, связанные с токсичностью, препятствовать выделению и отделению целевого продукта, усложнять контроль условий ферментации, благоприятных для целевого продукта, а также служить в качестве субстрата для загрязняющих микроорганизмов.

[005] Например, ацетогены, такие как *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium ragsdalei* (Köpke, *Appl Environ Microbiol*, 77: 5467-5475, 2011) и *Butyribacterium methylotrophicum* (Heiskanen, *Enzyme Microb Technol*, 41 362-367, 2007) могут продуцировать лактат в качестве побочного продукта. Это продуцирование лактата снижает эффективность и выход целевых продуктов, таких как бутанол, этанол или 2,3-бутандиол. Кроме того, лактат может быть токсичен для

ацетогенов, таких как *Clostridium autoethanogenum* даже в низких концентрациях (Köpke, *Appl Environ Microbiol*, 77: 5467-5475, 2011), и может служить в качестве субстрата для других бактерий, что приводит к большей вероятности бактериальной контаминации при продуцировании лактата. Кроме того, отделение лактата от других продуктов, таких как этанол, может потребовать трудоемких стадий обработки.

[006] Таким образом, существует насущная потребность в микроорганизмах и способах, которые уменьшают или устраняют получение побочных продуктов, таких как лактат.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[007] В настоящем изобретении предложена карбокситрофная ацетогенная бактерия, содержащая нарушающую мутацию в ферменте пути биосинтеза лактата. В одном варианте реализации нарушающая мутация уменьшает или устраняет экспрессию или активность фермента пути биосинтеза лактата.

[008] Нарушающая мутация влияет на способность бактерии продуцировать лактат. В одном варианте реализации бактерия согласно настоящему изобретению продуцирует уменьшенное количество лактата по сравнению с исходной бактерией. В одном варианте реализации бактерия согласно настоящему изобретению по существу не продуцирует лактат.

[009] Бактерия согласно настоящему изобретению может продуцировать продукты, такие как один или более из этанола, 2,3-бутандиола, формиата, пирувата, сукцината, валина, лейцина, изолейцина, малата, фумарата, 2-оксоглутарата, цитрата и цитрамалата. В одном варианте реализации бактерия согласно настоящему изобретению продуцирует увеличенное количество одного или более из этанола, 2,3-бутандиола, формиата, пирувата, сукцината, валина, лейцина, изолейцина, малата, фумарата, 2-оксоглутарата, цитрата и цитрамалата по сравнению с исходной бактерией.

[010] В одном варианте реализации фермент пути биосинтеза лактата представляет собой фермент, который исходно преобразует пируват в лактат. В предпочтительном варианте реализации фермент пути биосинтеза лактата представляет собой лактатдегидрогеназу (ЛДГ).

[011] Бактерия согласно настоящему изобретению может происходить из исходной бактерии, такой как *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* и *Clostridium ragsdalei*. В предпочтительном варианте реализации исходная бактерия представляет собой *Clostridium autoethanogenum*, депонированную в Немецкой

коллекции микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ) под номером доступа DSM23693.

[012] В настоящем изобретении также предложен способ получения продукта, включающий культивирование бактерии согласно изобретению в присутствии субстрата, содержащего CO, в результате чего бактерия продуцирует продукт.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[013] На фиг. 1 представлена диаграмма, показывающая стратегию нокаутирования ЛДГ, и праймеры, используемые для скрининга.

[014] Фиг. 2 представляет собой набор изображений гелей. На первом изображении геля показан скрининг на интеграцию одиночного кроссинговера плазмиды с нокаутом с использованием праймеров Og24r/Og35f для 5' кроссинговера и Og21f/Og36r для 3' кроссинговера у дикого типа (w) и трансконъюгантного клона 6 (6). На втором изображении геля показан скрининг на наличие двойного кроссинговера с использованием внешних праймеров, фланкирующих Og35f/ Og36r и Og21f/Og24r.

[015] На фиг. 3 представлено изображение геля, показывающее ПЦР колоний для Gene ID: 126803 Target 129S с применением праймеров LdhAF/R. Продукт ПЦР из 100 пар оснований указывает на генотип дикого типа, в то время как размер продукта из приблизительно 1,9 тыс. п.о. подтверждает вставку интрона группы II в участок-мишень.

[016] На фиг. 4 представлено изображение геля, показывающее потерю плазмиды с праймерами CatPR/RepHF. Потерю плазмиды проверяли путем амплификации маркера устойчивости (*catP*) и грамположительной точки начала репликации (pCB102).

[017] На фиг. 5A представлен график, иллюстрирующий ВЭЖХ-анализ *C. autoethanogenum* после 6 дней роста в бутылях для сыворотки при давлении 30 фунтов на квадратный дюйм (206843 Па) отработанного газа с металлургического производства (44% CO, 22% CO_2, 2% H_2, 32% N_2) в качестве субстрата. На фиг. 5B представлен график, иллюстрирующий ВЭЖХ-анализ *C. autoethanogenum* с инактивированной лактатдегидрогеназой после 6 дней роста в бутылях для сыворотки при давлении 30 фунтов на квадратный дюйм (206843 Па) отработанного газа с металлургического производства (44% CO, 22% CO_2, 2% H_2, 32% N_2) в качестве субстрата.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[018] Авторы настоящего изобретения обнаружили, что нарушение пути биосинтеза лактата у ацетогенной бактерии приводит к увеличенному или более

эффективному продуцированию продуктов, таких как этанол, 2,3-бутандиол, формиат, сукцинат, 2-оксоглутарат, валин, лейцин и изолейцин, по сравнению с исходным микроорганизмом, и может также приводить к увеличенному или более эффективному продуцированию пирувата, малата, фумарата и цитрата, которые являются предшественниками сукцината, 2-оксоглутарата, валина, лейцина и изолейцина. Продуцирование валина, лейцина, формиата и пирувата также устраняет необходимость дополнения культуральной среды с данными соединениями, что может привести к дальнейшей экономии затрат. Кроме того, уменьшение или устранение продуцирования лактата бактерией уменьшает или устраняет токсическое воздействие лактата на бактерии.

[019] В настоящем изобретении предложена карбокситрофная ацетогенная бактерия, содержащая нарушающую мутацию в ферменте пути биосинтеза лактата.

[020] “Мутация” относится к модификации нуклеиновой кислоты или белка в бактерии согласно настоящему изобретению по сравнению с диким типом или исходным микроорганизмом, из которых происходит бактерия согласно настоящему изобретению. Термин “генетическая модификация” включает в себя термин “мутация.” В одном варианте реализации мутация может представлять собой делецию, вставку или замену одного или более нуклеотидов в гене, кодирующем фермент. В другом варианте реализации мутация может представлять собой делецию, вставку или замену одной или более аминокислот в ферменте.

[021] Как правило, мутация представляет собой “нарушающую мутацию”, которая уменьшает или устраняет (т.е., “нарушает”) экспрессию или активность фермента пути биосинтеза лактата. Нарушающая мутация может частично инактивировать, полностью инактивировать или удалять фермент пути биосинтеза лактата или ген, кодирующий фермент. Нарушающая мутация может представлять собой нокаут-мутацию (knockout; KO). Нарушающей мутацией может быть любая мутация, которая уменьшает, предотвращает или блокирует биосинтез лактата. Нарушающая мутация может включать в себя, например, мутацию в гене, кодирующем фермент пути биосинтеза лактата, мутацию в генетическом регуляторном элементе, участвующем в экспрессии гена, кодирующего фермент пути биосинтеза лактата, встраивание нуклеиновой кислоты, которая продуцирует белок, который уменьшает или ингибирует активность фермента пути биосинтеза лактата, или встраивание нуклеиновой кислоты (например, антисмысловой РНК, миРНК, CRISPR) или белка, который ингибирует экспрессию фермента пути биосинтеза лактата.

[022] Нарушающая мутация приводит к получению бактерии согласно настоящему изобретению, которая не продуцирует лактат или по существу не продуцирует лактат или уменьшенное количество лактата по сравнению с исходной бактерией, из которой она получена. Например, бактерия согласно настоящему изобретению может не продуцировать лактат или продуцировать по меньшей мере приблизительно 1%, 3%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 95% менее лактата, чем исходная бактерия. Например, бактерия согласно настоящему изобретению может продуцировать менее, чем приблизительно 0,001, 0,01, 0,10, 0,30, 0,50 или 1,0 г/л лактата. В отличие от этого, в зависимости от условий ферментации, немодифицированная *C. autoethanogenum* LZ1561 может продуцировать приблизительно до 2 г/л лактата. Другие немодифицированные бактериальные штаммы могут продуцировать еще больше лактата.

[023] Нарушающую мутацию можно получить с использованием любого способа, известного в данной области техники. Типичные способы включают гетерологичную экспрессию генов, вставку или удаление гена или промотора, измененную экспрессию гена или инактивацию, инженерную энзимологию, направленную эволюцию, конструирование с применением методов искусственного интеллекта (knowledge-based design), методы случайного мутагенеза, генную перетасовку и оптимизацию кодонов. Такие способы описаны, например, в Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001; Pleiss, *Curr Opin Biotechnol*, 22: 611-617, 2011; и Park, Protein Engineering and Design, CRC Press, 2010. Нарушающую мутацию можно ввести с применением нуклеиновых кислот, таких как одноцепочечная или двухцепочечная ДНК, РНК, кДНК или их комбинации, как это уместно. Нуклеиновые кислоты могут быть отнесены к конструктам или векторам, и могут содержать один или более регуляторных элементов, точек начала репликации, сайты множественного клонирования и/или селективные маркеры. В одном варианте реализации нуклеиновая кислота может быть адаптирована для нарушения гена, кодирующего фермент пути биосинтеза лактата в исходной бактерии. В одном варианте реализации нуклеиновая кислота может быть адаптирована для обеспечения экспрессии одного или более генов, кодируемых нуклеиновой кислотой. Конструкты или векторы могут включать плазмиды (например, pMTL, pIMP, pJIR), вирусы (включая бактериофагов), космиды и искусственные хромосомы. Конструкты могут оставаться экстра-хромосомными при трансформации исходной бактерии или могут быть адаптированы для интеграции в геном бактерии. Соответственно, конструкты могут содержать последовательности нуклеиновых кислот, адаптированных для способствования

интеграции (например, область, которая позволяет гомологичную рекомбинацию и направленную интеграцию в геном хозяина) или экспрессии и репликации внехромосомного конструкта (например, точку начала репликации, промотор и другие регуляторные последовательности).

[024] Нуклеиновые кислоты можно вводить с использованием гомологичной рекомбинации. Такие нуклеиновые кислоты могут содержать плечи, гомологичные области внутри гена или фланкирующие ген, который нарушают (“гомологичные плечи”). Данные гомологичные плечи обеспечивают гомологичную рекомбинацию и введение, удаление или замену одного или более нуклеотидов в гене, который нарушают. Хотя предпочтительно, чтобы гомологичные плечи имели 100% комплементарность к целевой области в геноме, 100% комплементарность не требуется до тех пор, пока эта последовательность в достаточной степени комплементарна, чтобы обеспечить целевую рекомбинацию в целевой области в геноме. Как правило, гомологичные плечи будут иметь уровень гомологии, который позволяет гибридизацию в целевой области в жестких условиях (Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989). Информации о целевых последовательностях нуклеиновых кислот в исходной бактерии (т.е., последовательностях целевого гена или целевой области в исходной бактерии) обычно достаточно для разработки соответствующих гомологичных плеч. Например, для нарушения ЛДГ, можно использовать фланкирующие гомологичные плечи, описанные в настоящем документе (например, SEQ ID №: 1-2). В *C. ljungdahlii* гомологичные плечи могут быть разработаны на основе GenBank CP001666.1. Для других штаммов гомологичные плечи могут быть разработаны на основе другой общедоступной информации о последовательности нуклеиновой кислоты.

[025] “Путь биосинтеза лактата” представляет собой путь реакций, приводящих к образованию лактата. В одном варианте реализации путь биосинтеза лактата включает один или более ферментов, которые преобразуют пируват в лактат. В одном варианте реализации путь биосинтеза лактата включает фермент лактатдегидрогеназу. В зависимости от бактерии, в путь биосинтеза лактата могут быть вовлечены ряд различных ферментов. Когда бактерия содержит два или более ферментов в пути биосинтеза лактата, например, два или более ферментов, способных превращать пируват в лактат, нарушение более чем одного такого фермента может приводить к увеличению выработки продукта выше уровня, который можно достигнуть путем нарушения одного фермента. В одном варианте реализации бактерия содержит нарушающие мутации в двух, трех, четырех, пяти

или более ферментах, способных превращать пируват в лактат. В то время как нарушение экспрессии и/или активности всех таких ферментов может обеспечивать некоторые преимущества с точки зрения выработки продукции, обычно нет необходимости нарушать экспрессию и/или активность всех таких ферментов, чтобы получить преимущества изобретения, а именно увеличение выработки одного или более основных или целевых продуктов.

[026] В одном варианте реализации фермент пути биосинтеза лактата исходно (т.е., эндогенно или природно) преобразует пируват в лактат, таким образом, фермент обладает лактатдегидрогеназной активностью. Фермент может иметь дополнительные каталитические функции до тех пор, пока он также преобразует пируват в лактат. Например, фермент может являться любой дегидрогеназой, имеющей лактатдегидрогеназную активность. Внесение нарушающей мутации в фермент, который преобразует пируват в лактат, уменьшает или устраняет (т.е., “нарушает”) экспрессию или активность этого фермента.

[027] В предпочтительном варианте реализации фермент пути биосинтеза лактата представляет собой лактатдегидрогеназу (ЛДГ). Внесение нарушающей мутации в ЛДГ уменьшает или устраняет (т.е., “ нарушает”) экспрессию или активность ЛДГ.

[028] Бактерия согласно настоящему изобретению может содержать одну или более других генетических модификаций в дополнение к нарушающей мутации в ферменте пути биосинтеза лактата, включая генетические модификации одного или более генов или белков, не связанных с путем биосинтеза лактата.

[029] В одном конкретном варианте реализации бактерия согласно настоящему изобретению может экспрессировать ингибитор фермента пути биосинтеза лактата в дополнение или вместо наличия нарушающей мутации в ферменте пути биосинтеза лактата.

[030] “Ферментативная активность” в широком смысле относится к ферментативной активности, включая, но не ограничиваясь, активность фермента, количество фермента, или доступность фермента для катализа реакции. Соответственно, “снижение” или “уменьшение” ферментативной активности включает в себя снижение или уменьшение активности фермента, количества фермента или доступность фермента для катализа реакции. Фермент “способен превращать” первое соединение или субстрат во второе соединение или продукт, если он может катализировать реакцию, в которой по меньшей мере часть первого соединение превращается во второе соединение.

[031] Термин “варианты” включает нуклеиновые кислоты и белки, последовательности которых отличаются от эталонной последовательности

нуклеиновой кислоты и белка, такой как эталонная последовательность нуклеиновой кислоты и белка, описанной в известном уровне техники или приведенной в качестве примера в данном документе. Изобретение может быть реализовано на практике при использовании вариантов нуклеиновых кислот или белков, которые выполняют по существу ту же функцию, что и эталонная нуклеиновая кислота или белок. Например, вариант белка может выполнять по существу ту же самую функцию или катализировать по существу ту же реакцию, что и эталонный белок. Вариант гена может кодировать такой же или по существу такой же белок, что и эталонный ген. Вариант промотора может иметь по существу такую же способность обеспечивать экспрессию одного или более генов, что и эталонный промотор.

[032] Варианты нуклеиновых кислот или белков с по существу таким же уровнем активности как у эталонной нуклеиновой кислоты или белка могут упоминаться в настоящем документе как “функционально эквивалентные варианты.” В качестве примера, функционально эквивалентные варианты нуклеиновой кислоты могут включать в себя аллельные варианты, фрагменты гена, мутировавшие гены, полиморфизмы и тому подобное. Гомологичные гены от других микроорганизмов также являются примерами функционально эквивалентных вариантов. К ним относятся гомологичные гены у таких видов, как *Clostridium acetobutylicum, Clostridium beijerinckii* или *Clostridium ljungdahlii*, подробные сведения о которых находятся в свободном доступе на веб-сайтах, таких как Genbank или NCBI. Функционально эквивалентные варианты также включают в себя нуклеиновые кислоты, у которых последовательность изменяется в результате оптимизации кодона для конкретного организма. Функционально эквивалентный вариант нуклеиновой кислоты предпочтительно имеет по меньшей мере приблизительно 70%, приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 98% или более идентичности последовательности нуклеиновой кислоты (процент гомологии) с эталонной нуклеиновой кислотой. Функционально эквивалентный вариант белка предпочтительно имеет по меньшей мере приблизительно 70%, приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 98% или более идентичности последовательности аминокислот (процент гомологии) с эталонным белком. Функциональную эквивалентность варианта нуклеиновой кислоты или белка можно оценить с использованием любого способа, известного в данной области техники.

[033] Однако, варианты нуклеиновых кислот или белков также могут иметь уменьшенный уровень активности по сравнению с эталонной нуклеиновой кислотой или белком. Например, вариант нуклеиновой кислоты может иметь уменьшенный уровень экспрессии или вариант фермента может иметь уменьшенную способность катализировать конкретную реакцию по сравнению с эталонной нуклеиновой кислотой или ферментом, соответственно. Ферментные анализы и наборы для оценки активности ферментов в пути биосинтеза лактата известны в данной области техники (Wang, *J Bacteriol*, 195: 4373-4386, 2013; Sigma-Aldrich (MAK066), Thermo (88953); Worthington Biochemical Corporation (LS002755)).

[034] Нуклеиновые кислоты могут быть доставлены в бактерию согласно настоящему изобретению с использованием любого способа, известного в данной области техники. Например, нуклеиновые кислоты могут быть доставлены в виде “голых” нуклеиновых кислот или могут быть приготовлены с одним или более агентов (например, липосомы). В определенных вариантах реализации могут применяться ингибиторы рестрикции (Murray, *Microbiol Molec Biol Rev*, 64: 412-434, 2000). В качестве примера, трансформацию (включая трансдукцию или трансфекцию) можно достигнуть при помощи электропорации, обработки ультразвуком, полиэтиленгликоль-опосредованной трансформации, химической или природной компетентности, трансформации протопластов, индукции профага или конъюгации (см., например, Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989). Использование электропорации сообщалось для нескольких карбокситрофных ацетогенов, включая *Clostridium ljungdahlii* (Koepke, *PNAS*, 107:13087-13092, 2010; WO/2012/053905), *Clostridium autoethanogenum* (WO/2012/053905), *Clostridium aceticum* (Schiel-Bengelsdorf, *Synthetic Biol*, 15: 2191-2198, 2012) и *Acetobacterium woodii* (Strätz, *Appl Environ Microbiol*, 60: 1033-1037, 1994). Использование электропорации также сообщалось для *Clostridia*, включая *Clostridium acetobutylicum* (Mermelstein, *Biotechnol*, 10: 190-195, 1992) и *Clostridium cellulolyticum* (Jennert, *Microbiol*, 146: 3071-3080, 2000). Индукция профага была продемонстрирована для карбокситрофных ацетогенов, включая *Clostridium scatologenes* (Parthasarathy, Development of a Genetic Modification System in *Clostridium scatologenes* ATCC 25775 for Generation of Mutants, Masters Project, Western Kentucky University, 2010), и конъюгация была описана для многих *Clostridia*, включая *Clostridium difficile* (Herbert, *FEMS Microbiol Lett*, 229: 103-110, 2003) и *Clostridium acetobuylicum* (Williams, *J Gen Microbiol*, 136: 819-826, 1990). В некоторых вариантах реализации, имеющих активные ферментативные системы рестрикции может быть необходимо метилирование

нуклеиновой кислоты перед введением нуклеиновой кислоты в бактерию согласно изобретению (WO 2012/105853).

[035] Термин “рекомбинантный” указывает на то, что нуклеиновая кислота, белок или микроорганизм являются продуктом генетической модификации, мутации или рекомбинации. В целом, термин “рекомбинантный” относится к нуклеиновой кислоте, белку или микроорганизму, который содержит или кодируется с помощью генетического материала, полученного из различных источников, таких как два или более различных штамма или вида микроорганизмов. Используемый в данном документе термин “рекомбинантный” также может быть использован для описания микроорганизма, который содержит мутантную нуклеиновую кислоту или белок, включая мутантную форму эндогенной нуклеиновой кислоты или белка.

[036] “Исходная бактерия” («родительская бактерия») представляет собой бактерию, используемую для получения бактерии согласно настоящему изобретению. Исходная бактерия может представлять собой бактерию, встречающуюся в природе (т.е., бактерию дикого типа) или бактерию, которая была предварительно модифицирована (т.е., мутант или рекомбинантную бактерию). Бактерия согласно настоящему изобретению может быть модифицирована для того, чтобы экспрессировать меньшее количество фермента по сравнению с исходной бактерией, или бактерия согласно настоящему изобретению может быть модифицирована, чтобы не экспрессировать фермент, который экспрессируется исходной бактерией. В одном варианте реализации исходная бактерия представляет собой *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* или *Clostridium ragsdalei*. В предпочтительном варианте реализации исходная бактерия представляет собой *Clostridium autoethanogenum*, депонированную в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ) под номером доступа DSM23693 (т.е., *Clostridium autoethanogenum* LZ1561).

[037] Термин “происходит из” указывает на то, что нуклеиновая кислота, белок или микроорганизм модифицирован или основан на другой (например, исходной или дикого типа) нуклеиновой кислоте, белке или микроорганизме с получением новой нуклеиновой кислоты, белка или микроорганизма. Такие модификации или адаптации, как правило, включают вставку, делецию, мутацию или замену нуклеиновых кислот или генов. Обычно, бактерия согласно настоящему изобретению происходит из исходной бактерии. В одном варианте реализации бактерия согласно настоящему изобретению происходит из *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* или *Clostridium ragsdalei*. В предпочтительном варианте реализации бактерия согласно настоящему

изобретению происходит из *Clostridium autoethanogenum* LZ1561, которая депонирована в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ) под номером доступа DSM23693.

[038] В одном варианте реализации исходная бактерия выбрана из группы состоящей из карбокситрофных ацетогенных бактерий, включающих виды *Clostridium autoethanogenum, Clostridium ljungdahlii, Clostridium ragsdalei, Clostridium coskatii, Clostridium carboxidivorans, Clostridium drakei, Clostridium scatologenes, Clostridium aceticum, Clostridium formicoaceticum, Clostridium magnum, Acetobacterium woodii, Alkalibaculum bacchii, Moorella thermoacetica, Sporomusa ovate, Butyribacterium methylotrophicum, Blautia producta, Eubacterium limosum* и *Thermoanaerobacter kiuvi.* Данные карбокситрофные ацетогенные бактерии характеризуются способностью хемоавтотрофно расти на газообразных одноуглеродных источниках, таких как монооксид углерода (CO) и диоксид углерода (CO_2), использовать монооксид углерода (CO) и/или водород (H_2) в качестве источников энергии в анаэробных условиях, и производить ацетил-КоА, ацетат и другие продукты. Они имеют один и тот же способ ферментации, путь Вуда-Льюнгдаля или восстановительный путь ацетил-КоА, и характеризуются наличием набора ферментов, состоящих из дегидрогеназы монооксида углерода (CODH), гидрогеназы, формиатдегидрогеназы, формил-тетрафолатсинтетазы, метилен-тетрафолатдегидрогеназы, формил-тетрафолатциклогидролазы, метилен-тетрафолатредуктазы, и дегидрогеназы монооксида углерода/ацетил-КоА-синтетазы (CODH/ACS), указанная комбинация характерна и уникальна для данного типа бактерий (Drake, The Prokaryotes, 354-420, Springer, New York, NY, 2006). В отличие от хемогетеротрофно растущих бактерий, сбраживающих сахара, которые преобразуют субстрат в биомассу, вторичные метаболиты и пируват из которых непосредственно или через ацетил-КоА образуются продукты, ацетогены преобразуют субстрат непосредственно в ацетил-КоА, из которых образуются продукты, биомасса и вторичные метаболиты.

[039] В предпочтительном варианте реализации бактерия согласно настоящему изобретению происходит из исходного микроорганизма, содержащего лактатдегидрогеназу, при этом бактерия согласно настоящему изобретению содержит disrupting mutation в лактатдегидрогеназе. Например, исходный микроорганизм может представлять собой *C. autoethanogenum*, которая содержит последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую GenBank AEI90736.1, или аминокислотную последовательность, содержащую GenBank CP006763.1, KEGG CAETHG_1147 или GenBank HQ876025.1. Исходный микроорганизм может представлять собой *C. ljungdahlii*, который содержит последовательность

нуклеиновой кислоты, содержащую GenBank YP_003781368.1, или аминокислотную последовательность, содержащую GenBank CP001666.1 или KEGG CLJU_c32190. Исходный микроорганизм может представлять собой *C. ragsdalei*, который содержит последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую GenBank AEI90737.1, или аминокислотную последовательность, содержащую GenBank HQ876026.1. Другие исходные бактерии могут иметь другие последовательности нуклеиновых кислот и аминокислотные последовательности.

[040] "Карбокситроф" представляет собой микроорганизм способный выдерживать высокую концентрацию монооксида углерода (CO). Как правило, бактерия согласно настоящему изобретению является карбокситрофом.

[041] Бактерия согласно настоящему изобретению может происходить из кластера карбокситрофных *Clostridia*, включая виды *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium ragsdalei,* и родственные изоляты, включая, но не ограничиваясь, штаммы *Clostridium autoethanogenum* JAI-1T (DSM10061) (Abrini, *Arch Microbiol*, 161: 345-351, 1994), *Clostridium autoethanogenum* LBS1560 (DSM19630) (WO 2009/064200), *Clostridium autoethanogenum* LZ1561 (DSM23693), *Clostridium ljungdahlii* PETCT (DSM13528 = ATCC 55383) (Tanner, *Int J Syst Bacteriol*, 43: 232-236, 1993), *Clostridium ljungdahlii* ERI-2 (ATCC 55380) (патент США № 5593886), *Clostridium ljungdahlii* C-01 (ATCC 55988) (патент США № 6368819), *Clostridium ljungdahlii* O-52 (ATCC 55989) (патент США № 6368819), *Clostridium ragsdalei* P11T (ATCC BAA-622) (WO 2008/028055), родственные изоляты, такие как "*Clostridium coskatii*" (публикация патента США 2011/0229947), или мутантные штаммы, такие как *Clostridium ljungdahlii* OTA-1 (Tirado-Acevedo, Production of Bioethanol from Synthesis Gas Using *Clostridium ljungdahlii*, PhD thesis, North Carolina State University, 2010).

[042] Данные штаммы образуют подкластер в пределах *Clostridial* рРНК кластера I и их 16S рРНК ген более чем на 99% идентичен с аналогичным низким содержанием GC приблизительно 30%. Однако, эксперименты ДНК-ДНК реассоциации и ДНК-дактилоскопии показали, что данные штаммы принадлежат к разным видам (WO 2008/028055). Штаммы этого кластера характеризуются общими чертами, имеют аналогичный генотип и фенотип, и все они имеют один и тот же способ сохранения энергии и ферментативного обмена веществ. Кроме того, у штаммов данного кластера отсутствуют цитохромы и сохранение энергии с помощью Rnf-комплекса. Все виды данного кластера имеют одинаковую морфологию и размер (логарифмический растущие клетки от 0,5-0,7 x 3-5 мкм), являются мезофильными (оптимальная температура роста между 30-37 °C) и строго анаэробными (Abrini, *Arch Microbiol*, 161: 345-351, 1994; Tanner, *Int J Syst Bacteriol*, 43: 232-236, 1993; и WO

2008/028055). Более того, все они имеют одни и те же основные филогенетические черты, например как один и тот же диапазон pH (pH 4-7,5, с оптимальным начальным pH 5,5-6), строго автотрофный рост на CO-содержащих газах с аналогичными темпами роста и аналогичным метаболитическим профилем с этанолом и уксусной кислотой в качестве основных конечных продуктов ферментации, а также небольшим количеством 2,3-бутандиола и молочной кислоты, образующихся в определенных условиях (Abrini, *Arch Microbiol*, 161: 345-351, 1994; Köpke, *Curr Opin Biotechnol*, 22: 320-325, 2011; Tanner, *Int J Syst Bacteriol*, 43: 232-236, 1993; и WO 2008/028055). А также наблюдется продуцирование индола во всех трех видах.

[043] Однако, виды дифференцируются по утилизации субстрата в виде различных сахаров (например, рамнозы, арабинозы), кислот (например, глюконата, цитрата), аминокислот (например, аргинина, гистидина) или других субстратов (например, бетаина, бутанола). Более того, некоторые виды были признаны ауксотрофными по отношению к некоторым витаминам (например, тиамину, биотину), в отличие от других видов. Было установлено, что организация и число генов пути Вуда-Льюнгдаля, ответственных за поглощение газа, являются одинаковыми у всех видов, несмотря на различия в последовательности нуклеиновых кислот и аминокислот (Köpke, *Curr Opin Biotechnol*, 22: 320-325, 2011). Кроме того, для ряда данных микроорганизмов было показано восстановление карбоновых кислот в их соответствующие спирты (Perez, *Biotechnol Bioeng*, 110:1066-1077, 2012). Таким образом, эти признаки не являются специфическими для одного микроорганизма, как *Clostridium autoethanogenum* или *Clostridium ljungdahlii*, а являются довольно общими признаками для карбокситрофных, этанол-синтезирующих *Clostridia*, и можно ожидать, у этих штаммов механизмы работают сходным образом, хотя могут иметься отличия в их реализации.

[044] “Ацетоген” представляет собой микроорганизм, который вырабатывает или способен вырабатывать ацетат в качестве продукта анаэробного дыхания. Как правило, ацетогены являются облигатно анаэробными бактериями, которые используют путь Вуда-Льюнгдаля в качестве основного механизма для сохранения энергии и для синтеза ацетил-КоА и ацетил-КоА-производных продуктов, таких как ацетат (Ragsdale, *Biochim Biophys Acta*, 1784: 1873-1898, 2008). В предпочтительном варианте реализации бактерия согласно настоящему изобретению представляет собой ацетоген.

[045] В настоящем изобретении также предложен способ получения продукта, включающий культивирование бактерии согласно настоящему изобретению в

присутствии субстрата, содержащего CO, в результате чего бактерия согласно настоящему изобретению продуцирует продукт.

[046] Термин “субстрат” относится к источнику углерода и/или источнику энергии для бактерии согласно настоящему изобретению. Как правило, субстрат представляет собой газообразный субстрат, который содержит монооксид углерода (CO). Субстрат может содержать основную долю CO, например, приблизительно от 20% до 100%, от 20% до 70%, от 30% до 60% или от 40% до 55% CO по объему. В конкретных вариантах реализации субстрат содержит приблизительно 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55% или 60% CO по объему. Бактерия согласно настоящему изобретению обычно преобразует по меньшей мере часть CO из субстрата в продукту.

[047] Хотя это не является необходимым, чтобы субстрат содержал какое-либо количество водорода (H_2), присутствие H_2 не должно негативно влиять на образование продукта и может приводить к улучшенной общей эффективности. Например, в конкретных вариантах реализации субстрат может содержать приблизительное соотношение 2:1, 1:1 или 1:2 H_2:CO. В одном варианте реализации субстрат содержит менее приблизительно 30%, 20%, 15% или 10% H_2 по объему. В других вариантах реализации субстрат содержит низкие концентрации H_2, например, менее 5%, менее 4%, менее 3%, менее 2% или менее 1% H_2. В других вариантах реализации субстрат по существу не содержит H_2.

[048] Субстрат также может содержать диоксид углерода (CO_2), например, приблизительно от 1% до 80% или от 1% до 30% CO_2 по объему. В одном варианте реализации субстрат содержит менее приблизительно 20% CO_2 по объему. В других вариантах реализации субстрат содержит менее приблизительно 15%, 10% или 5% CO_2 по объему. В другом варианте реализации субстрат по существу не содержит CO_2.

[049] Несмотря на то, что субстрат обычно газообразный, субстрат также может находиться в альтернативных формах. Например, субстрат может быть растворен в жидкости, насыщенной CO-содержащим газом с применением дисперсионного генератора микропузырьков (Hensirisak, *Appl Biochem Biotechnol*, 101: 211-227, 2002). В качестве еще одного примера, субстрат может быть адсорбирован на твердой подложке.

[050] Субстрат может представлять собой отработанный газ, полученный в качестве побочного продукта промышленного процесса или из какого-либо другого источника, например, из автомобильных выхлопных газов или газификации биомассы. В некоторых вариантах реализации промышленный процесс выбран из

группы, состоящей из производства продуктов из черных металлов, таких как сталеплавильное производство, производства продуктов из цветных металлов, процессов переработки нефти, газификации угля, производства электроэнергии, производства углеродной сажи, производства аммиака, производства метанола и производства кокса. В указанных вариантах реализации CO-содержащий газ можно отобрать из производственного процесса до попадания в атмосферу при помощи любого удобного способа. CO может быть компонентом синтез-газа, т.е., газа, содержащего монооксид углерода и водород. CO, образующийся в промышленных процессах, обычно сжигают с получением CO_2 и, следовательно, изобретение имеет особую практическую значимость в сокращении выбросов парниковых газов CO_2. Состав субстрата может оказывать существенное влияние на эффективность и/или стоимость реакции. Например, присутствие кислорода (O_2) может привести к снижению эффективности анаэробного процесса ферментации. В зависимости от состава субстрата может быть желательно обрабатывать, промывать или фильтровать субстрат для удаления нежелательных примесей, таких как токсины, нежелательные компоненты или частицы пыли, и/или увеличивать концентрацию желаемых компонентов.

[051] Бактерию согласно настоящему изобретению можно культивировать для получения одного или более продуктов. Как правило, бактерия согласно настоящему изобретению продуцирует один или более продуктов выбранных из группы, состоящей из этанола, 2,3-бутандиола, формиата, пирувата, сукцината, валина, лейцина, изолейцина, малата, фумарата, 2-оксоглутарата, цитрата и цитрамалата. Бактерия согласно настоящему изобретению может также продуцировать другие продукты, такие как ацетолактат или ацетоина малат.

[052] В предпочтительном варианте реализации бактерия согласно настоящему изобретению продуцирует увеличенное количество одного или более из этанола, 2,3-бутандиола, формиата, пирувата, сукцината, валина, лейцина, изолейцина, малата, фумарата, 2-оксоглутарата, цитрата и цитрамалата по сравнению с исходной бактерией. Например, бактерия согласно настоящему изобретению может продуцировать приблизительно 1%, 3%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200%, 300%, 400% или 500% более одного или более продуктов по сравнению с исходной бактерией от которой происходит бактерия согласно настоящему изобретению. Это увеличение выработки продукта может быть вызвано по меньшей мере частично нарушающей мутацией в ферменте пути биосинтеза лактата, которая перенаправляет углерод и энергию от образования лактата к образованию других продуктов.

[053] Термин “основной продукт” относится к единственному продукту, продуцируемому в самой высокой концентрации и/или выходе. В одном варианте реализации основным продуктом является этанол или 2,3-бутандиол.

[054] Кроме того, можно спроектировать бактерию согласно настоящему изобретению, чтобы способствовать получению одного или более продуктов помимо одного или более других продуктов. Например, нарушение превращения пирувата в лактат может способствовать образованию 2,3-бутандиола, формиата, малата, фумарата, цитрата, сукцината и 2-оксоглутарата помимо производства валина, лейцина и изолейцина.

[055] В настоящем документе упоминание продукта (например, цитрата) включает в себя как солевые (например, цитрат) так и кислотные (например, лимонную кислоту) формы продукта. Зачастую в ферментационном бульоне будет присутствовать смесь солевой и кислотной формы продукта, соотношение которых изменяется в зависимости от pH бульона. В качестве дополнительных примеров, термин “ацетат” охватывает ацетат и уксусную кислоту, термин “формиат” охватывает формиат и муравьиную кислоту, термин “малат” охватывает малат и яблочную кислоту, а термин “лактат” охватывает лактат и молочную кислоту.

[056] Если контекст не требует иного, ссылка на любое соединение в настоящем документе, которое может существовать в одной или нескольких изомерных формах (например, D, L, мезо-, S, R, цис- или транс-формах), следует рассматривать в общем смысле, чтобы охватить любой из одного или более таких изомеров соединения. Например, ссылка на “лактат” в общем случае охватывает как D, так и L-изомеры лактата.

[057] Как правило, культивирование осуществляют в биореакторе. Термин “биореактор” включает в себя устройство для культивирования/ферментации, состоящее из одной или более емкостей, башен или системы трубопроводов, например как, проточный реактор с мешалкой (CSTR), реактор с иммобилизованным клетками (ICR), реактор с орошаемым слоем (TBR), барботажная колонна, газлифтный ферментатор, статический смеситель или другой сосуд или другое устройство, подходящее для газожидкостного контакта. В некоторых вариантах реализации биореактор может содержать первый реактор для роста и второй реактор для культивирования/ферментации. Субстрат может подаваться в один или оба эти реактора. Применяемые в данном описании, термины “культивирование” и “ферментация” используются взаимозаменяемо. Данные термины охватывают как фазу роста, так и фазу биосинтеза продукта в процессе культивирования/ферментации.

[058] Культуру обычно поддерживают в водной культуральной среде, содержащей питательные вещества, витамины и/или минералы, достаточные для возможности роста бактерий. Предпочтительно водная питательная среда является минимальной анаэробной микробной ростовой средой. Подходящие среды известны в данной области техники и описаны, например, в патенте США №5173429, в патенте США №5593886 и WO 2002/008438.

[059] Культивирование/ферментацию желательно проводить в условиях, подходящих для получения целевого продукта. Условия реакции, на которые следует обратить внимание, включают давление (или парциальное давление CO), температуру, скорость потока газа, скорость потока жидкости, pH среды, окислительно-восстановительный потенциал среды, скорость перемешивания (при использовании проточного реактора с мешалкой), уровень инокулята, максимальные концентрации субстратного газа, чтобы гарантировать, что CO в жидкой фазе не становится лимитирующим фактором, а также максимальные концентрации продукта, чтобы избежать ингибирования продукции. В частности, можно регулировать скорость введения CO-содержащего субстрата, чтобы гарантировать, что концентрация CO в жидкой фазе не становится лимитирующим фактором, так как в CO-лимитирующих условиях культура может потреблять продукты.

[060] Термины “увеличение эффективности,” “увеличенная эффективность” и тому подобные, при использовании по отношению к процессу ферментации, включают, но не ограничиваются, увеличение одного или более из скорости роста микроорганизмов, катализирующих ферментацию, скорости роста и/или продуцирования продукта, объема желаемого продукта (такого как спирты), полученного на единицу объема потребленного субстрата, скорости продуцирования или уровня продуцирования желаемого продукта, и относительной доли желаемого продукта, пролеченного по сравнению с другими побочными продуктами ферментации.

[061] Эксплуатация биореактора при увеличенном давлении позволяет увеличить скорость массопереноса CO из газовой фазы в жидкую фазу. Соответственно, в целом предпочтительно проводить культивирование/ферментацию при давлении выше атмосферного давления. Кроме того, поскольку данный коэффициент конверсии CO отчасти зависит от времени удерживания субстрата и временя удерживания обуславливает необходимый объем биореактора, использование систем под давлением может значительно уменьшить требуемый объем биореактора и, следовательно, капитальные затраты на оборудование для

культивирования/ферментации. В соответствии с примерами в патенте США 5593886, объем реактора может быть прямо пропорционально уменьшен при увеличении рабочего давления в реакторе. Другими словами, для биореактора с рабочим давлением 10 атмосфер необходима только одна десятая объема биореактора, работающего при давлении 1 атмосфера. Кроме того, в WO 2002/008438 описана ферментация с превращением газа в этанол, выполняемая под давлением 30 фунтов на квадратный дюйм избыточного давления и 75 фунтов на квадратный дюйм избыточного давления, с получением продуктивности этанола 150 г/л/сут и 369 г/л/сут, соответственно. В противоположность этому, было обнаружено, что при осуществлении ферментации с использованием аналогичных питательных сред и вводом композиций газов при атмосферном давлении, получали от 10 до 20 раз меньше этанола на литр в сутки.

[062] Способ по настоящему изобретению может дополнительно включать выделение или очистку одного или более продуктов. Например, этанол или смешанный поток спирта, содержащий этанола и/или другие продукты, можно выделить из ферментационного бульона любым способом, известным в данной области техники, включая фракционную перегонку, выпаривание, первапорацию или экстрактивную ферментацию (например, экстракцию жидкость-жидкость). Побочные продукты, такие как ацетат или кислоты, также можно извлечь из ферментационного бульона с использованием любого способа, известного в данной области техники, включая системы адсорбции с активированным углем, электродиализ или непрерывную отдувку газом. В одном варианте реализации продукт можно выделять из ферментационного бульона путем непрерывного удаления части бульона из биореактора, отделения микробных клеток от бульона (обычно путем фильтрации) и выделения продукта из бульона. Отделенные микробные клетки можно возвращать в биореактор. Кроме того, пермеат, свободный от клеток, также можно возвращать в биореактор после извлечения продукта, необязательно с добавлением питательных веществ, таких как витамины группы В.

[063] Сукцинат можно выделять из ферментационного бульона с использованием, например, подкисления, электродиализа в сочетании с ионообменной хроматографией (Song, *Enzyme Microb Technol*, 39: 352-361, 2006), осаждения с помощью Ca(OH) в сочетании с фильтрацией и добавлением серной кислоты (Lee, *Appl Microbiol Biotechnol*, 79: 11-22, 2008) или реакционной экстракции с экстрагентами на основе аминов, таких, как три-*н*-октиламин (Huhet, *Proc Biochem* 41: 1461-1465, 2006). Для всех способов, крайне важно получить кислоту свободной форме, а не соль. Большинство биотехнологических способов получения янтарной

кислоты, однако, работают при нейтральном или слегка кислом pH 6-7. С учетом pKa янтарной кислоты (pKa = 4,16 и 5,61), в этих условиях основная часть янтарной кислоты присутствует в виде соли, а не в виде свободной кислоты. Однако, известно, что *C. autoethanogenum* и другие карбокситрофные ацетогены, устойчивы и растут при требуемом низком pH 4-6.

[064] Аминокислоты с разветвленной цепью, такие как валин, лейцин и изолейцин, может быть выделены из ферментационного бульона с использованием концентрирования (например, путем обратного осмоса), кристаллизации или удаления биомассы (например, с помощью ультрафильтрации или центрифугирования), или ионообменной хроматографии (Ikeda, Microbial Production of L-Amino Acids, 1-35, 2003).

[065] 2,3-бутандиол, формиат, 2-оксоглутарат и другие продукты могут быть выделены из ферментационного бульона с использованием любого способа, известного в данной области техники. Например, низкие концентрации 2,3-бутандиола можно извлечь при помощи мембранных технологий, таких как электродиализ, предусматривающий применение подходящего потенциала через селективную ионпроницаемую мембрану. Другие подходящие способы включают нанофильтрацию, при которой одновалентные ионы под давлением селективно проходят через мембрану.

ПРИМЕРЫ

[066] Следующие примеры дополнительно иллюстрируют изобретение, однако, естественно, их не следует рассматривать как каким-либо образом ограничивающие его объем.

Пример 1

[067] Данный пример описывает основные материалы и способы.

[068] *C. autoethanogenum* DSM10061 и DSM23693 (происходящий из DSM10061) и *C. ljungdahlii* DSM13528 были получены из DSMZ (Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур, Инхоффенштрассе 7 B, 38124 Брауншвейг, Германия). *C. ragsdalei* ATCC BAA-622 был получен из ATCC (Американской коллекции типовых культур, Манассас, Вирджиния 20108, США). *E. coli* DH5α был получен от Invitrogen (Карлсбад, Калифорния 92008, США).

[069] *E. coli* выращивали в аэробных условиях при 37 °C на среде ЛБ (Лурия-Бертани) среде. Твердая среда содержала 1,5% агара.

Компоненты ЛБ среды	Количество на 1 л ЛБ среды
Триптон	10 г
Дрожжевой экстракт	5 г
NaCl	10 г

[070] Штаммы *Clostridium* выращивали при 37 °C на PETC среде при pH 5,6 с использованием стандартных анаэробных способов (Hungate, *Methods Microbiol*, 3B: 117-132, 1969; Wolfe, *Adv Microbiol Physiol*, 6: 107-146, 1971). В качестве субстрата использовали фруктозу (гетеротрофный рост) или CO-содержащий газ с металлургического производства под давлением в 30 фунтов на квадратный дюйм (собранный на участке New Zealand Steel в Гленбруке, Новая Зеландия, состав: 44% CO, 32% N_2, 22% CO_2, 2% H_2) в паровой фазе (автотрофный рост). Для твердой среды добавляли 1,2% бактоагара (BD, Фрэнклин Лэйкс, Нью-Джерси 07417, США).

Компоненты PETC среды	Количество на 1 л PETC среды
NH_4Cl	1 г
KCl	0,1 г
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2 г
NaCl	0,8 г
KH_2PO_4	0,1 г
$CaCl_2$	0,02 г
Раствор микроэлементов (см. ниже)	10 мл
Витаминный раствор Вульфа (см. ниже)	10 мл
Дрожжевой экстракт (необязательно)	1 г
Ресазурин (2 г/л биомассы)	0,5 мл
$NaHCO_3$	2 г
Раствор восстанавливающего агента (см. ниже)	0,006-0,008 % (об./об.)
Фруктоза (для гетеротрофного роста)	5 г

Компоненты раствора микроэлементов	Количество на 1 л раствора микроэлементов
Нитрилтриуксусная кислота	2 г
$MnSO_4 \cdot H_2O$	1 г
$Fe(SO_4)_2(NH_4)_2 \cdot 6H_2O$	0,8 г
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,2 г
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2 мг
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,02 г
$NaMoO_4 \cdot 2H_2O$	0,02 г
Na_2SeO_3	0,02 г
$NiCl_2 \cdot 6H_2O$	0,02 г
$Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$	0,02 г

Компоненты витаминного раствора Вульфа	Количество на 1 л витаминного раствора Вульфа
Биотин	2 мг
Фолиевая кислота	2 мг
Пиридоксина гидрохлорид	10 мг
Тиамин HCl	5 мг
Рибофлавин	5 мг
Никотиновая кислота	5 мг
Кальций D-(+)-пантотенат	5 мг
Витамин B12	0,1 мг
Парааминобензойная кислота	5 мг
Тиоктовая кислота	5 мг

Компоненты раствора восстанавливающего агента	Количество на 100 мл раствора восстанавливающего компонента
NaOH	0,9 г
Цистеин-HCl	4 г

Na_2S	4 г

[071] Ферментации с *C. autoethanogenum* DSM23693 проводили в 1,5 л биореакторах при 37 °C с использованием CO-содержащего газ с металлургического производства в качестве единственного источника энергии и углерода. Готовили среду определенного состава, содержащую: MgCl, $CaCl_2$ (0,5 мМ), KCl (2 мМ), H_3PO_4 (5 мМ), Fe (100 мкМ), Ni, Zn (5 мкМ), Mn, B, W, Mo, Se (2 мкМ). Среду переносили в биореактор и автоклавировали при температуре 121 °C в течение 45 минут. После автоклавирования, среду дополняли тиамином, пантотенатом (0,05 мг/л), и биотином (0,02 мг/л) и восстанавливали с 3 мМ цистеина HCl. Для достижения анаэробных условий, реакционный сосуд продували азотом через фильтр с размером пор 0,2 мкм. Перед инокуляцией, газ заменяли на CO-содержащий газ с металлургического производства, непрерывно подавая его в реактор. Поток газа первоначально устанавливали на уровне 80 мл/мин и увеличивали до 200 мл/мин во время середины экспоненциальной фазы, при этом перемешивание увеличивали с 200 оборотов в минуту до 350 оборотов в минуту. Na_2S дозировано вводили в биореактор в количестве 0,25 мл/ч. После того, как ОП600 достигала 0,5, биореактор переводили в непрерывный режим со скоростью 1,0 мл/мин (скорость разбавления 0,96 d^{-1}). Образцы отбирали для измерения биомассы и метаболитов. Кроме того, на регулярной основе осуществляли парофазный анализ входящего и выходящего газового потока.

[072] Состав газа в паровой фазе измеряли на газовом хроматографе Varian CP-4900 micro GC с двумя установленными каналами. Канал 1 представлял собой десятиметровую молекулярно-ситовую колонку, работающую при температуре 70 °C, 200 кПа аргона и временем полуобратной продувки 4,2 с, в то время как канал 2 представлял собой десятиметровую колонку PPQ, работающую при температуре 90 °C, 150 кПа гелия и отсутствием полуобратной продувки. Температура инжектора для обоих каналов составляла 70 °C. Времена анализа устанавливали на 120 секунд, однако все целевые пики, как правило, элюируются до 100 секунд.

[073] ВЭЖХ-анализ метаболических конечных продуктов проводили с использованием ВЭЖХ системы Agilent серии 1100, оснащенной RID (рефрактометрическим детектором), работающим при 35 °C, и кислотоорганической колонкой Alltech IOA-2000 (150 x 6,5 мм, размер частиц 5 мкм), термостатируемой при 60 °C. В качестве подвижной фазы использовали слегка подкисленную воду (0,005 M H_2SO_4) при скорости потока 0,7 мл/мин. Для удаления белков и других клеточных остатков, 400 мкл образцов смешивали с 100 мкл 2% (масс./об.) 5-

сульфосалициловой кислоты и центрифугировали при 14000 x g в течение 3 мин для отделения осажденных остатков. Далее для проведения анализов в ВЭЖХ-хроматограф вводили 10 мкл супернатанта.

[074] ГХ-анализ метаболических конечных продуктов проводили с использованием газового хроматографа с равновесной паровой фазой Agilent 6890N, оснащенного волокном Supelco PDMS 100 1 см, колонкой Alltech EC-1000 (30 м x 0,25 мм x 0,25 мкм) и пламенно-ионизационным детектором (FID). 5 мл образцов переносили в пробирку Хангейта, нагревали до 40 °C на водяной бане и экспонировали на волокне в течение ровно 5 мин. Инжектор выдерживали при 250 °C и в качестве газа-носителя использовали гелий с постоянным расходом 1 мл/мин. Программа термостата составляла 40 °C в течение 5 мин с последующим увеличением на 10 °C/мин до 200 °C. Далее температуру дополнительно увеличивали до 220 °C со скоростью 50 °C/мин с последующей пятиминутной выдержкой при данной температуре, перед снижением температуры до 40 °C со скоростью 50 °C/мин и окончательной выдержкой в течение 1 мин. FID выдерживали при 250 °C при 40 мл/мин водорода, 450 мл/мин воздуха и 15 мл/мин азота в качестве вспомогательного газа.

[075] Во время эксперимента полной трансформации, *C. autoethanogenum* DSM23693 выращивали на среде YTF в присутствии восстанавливающих агентов и отработанного газа с металлургического производства под давлением в 30 фунтов на квадратный дюйм (собранный на участке New Zealand Steel в Гленбруке, Новая Зеландия, состав: 44% CO, 32% N_2, 22% CO_2, 2% H_2) при температуре 37 °C с использованием стандартных анаэробных способов (Hungate, *Methods Microbiol*, 3B: 117-132, 1969; Wolfe, *Adv Microbiol Physiol*, 6: 107-146, 1971).

Компоненты среды YTF	Количество на 1 л среды YTF
Дрожжевой экстракт	10 г
Триптон	16 г
Натрия хлорид	0,2 г
Фруктоза	10 г
Дистиллированная вода	до 1 л

Компоненты раствора восстанавливающего агента	Количество на 100 мл раствора восстанавливающего агента
NaOH	0,9 г
Цистеин-HCl	4 г

Na_2S	4 г
Дистиллированная вода	до 100 мл

[076] Для получения компетентных клеток, 50 мл культуры *C. autoethanogenum* DSM23693 пересевали на свежую среду YTF в течение 5 дней подряд. Данные клетки использовали для инокуляции 50 мл среды YTF, содержащей 40 мМ DL-треонина, при $ОП_{600нм}$ соответствующей 0,05. При достижении культурой $ОП_{600нм}$, соответствующей 0,5, клетки инкубировали на льду в течение 30 минут и далее переносили в анаэробную камеру и собирали при 4700 x g и 4 °C. Культуру дважды промывали ледяным буфером для электропорации (270 мМ сахарозы, 1 мМ $MgCl_2$, 7 мМ фосфата натрия, pH 7,4) и окончательно суспендировали в объеме 600 мкл свежего буфера для электропорации. Данную смесь переносили в предварительно охлажденную кювету для электропорации с 0,4 см электродным зазором, содержащую 2 мкг смеси метилированной плазмиды и 1 мкл ингибитора рестрикции типа 1 (Epicentre Biotechnologies), и немедленно генерировали импульсы с применением системы электропорации Gene Pulser Xcell (Bio-Rad) со следующими параметрами: 2,5 кВ, 600 Ом и 25 мкФ. Была достигнута временная константа в 3,7-4,0 мсек. Культуру переносили в 5 мл свежей среды YTF. Регенерацию клеток контролировали при длине волны в 600 нм с использованием спектрофотометра Spectronic Helios Epsilon (Thermo), оборудованного держателем для пробирок. После первоначального уменьшения в биомассе, клетки начинали расти снова. После удвоения биомассы с того момента, приблизительно 200 мкл культуры высевали на чашки с агаром YTF и чашки с агаром PETC, содержащие 5 г/л фруктозы (обе содержащие 1,2% бактоагара и 15 мкг/мл тиамфеникола). После 3-4 дней инкубации при 37 °C с газом с металлургического производства под давлением в 30 фунтов на квадратный дюйм, были хорошо различимы 500 колоний на чашку.

[077] *C. autoethanogenum:* Для проверки идентичности шести клонов и переноса ДНК, геномную ДНК выделяли из всех 6 колоний/клонов в жидкой среде PETC с применением мини-набора PURELINK™ Genomic DNA (Invitrogen) согласно инструкции производителя. Данные геномные ДНК наряду с диким типом *C. autoethanogenum* DSM23693 использовали в качестве матрицы в ПЦР. ПЦР осуществляли с высокоточной ДНК-полимеразой iproof High Fidelity DNA Polymerase (Bio-Rad Labratories) со специфическими праймерами, как описано в примерах, приведенных ниже, и по следующей схеме: начальная денатурация при 98 °C в течение 2 мин с последующими 25 циклами денатурации (98 °C в течение 10 сек), ренатурации (61 °C в течение 15 сек) и элонгации (72 °C в течение 90 сек) до стадии

конечной элонгации (72 °C в течение 7 мин). Геномную ДНК из дикого типа *C. autoethanogenum* DSM23693 использовали в качестве матрицы в контрольной ПЦР.

[078] Для подтверждения идентичности клонов, также осуществляли ПЦР для 16s рРНК гена с применением праймеров fD1 (SEQ ID №: 10) и rP2 (SEQ ID №: 11) и применением условий ПЦР согласно приведенному выше описанию. Продукты ПЦР очищали с применением набора Zymo CLEAN AND CONCENTRATOR™ и секвенировали с применением праймера rP2.

Пример 2

[079] Данный пример демонстрирует генетическую модификацию *C. autoethanogenum* для подавления активности лактатдегидрогеназы.

[080] Демонстрацию инактивации идентифицированного (Köpke, *Appl Environ Microbiol*, 77: 5467-5475, 2011) гена *ldh* (HQ876025.1) лактатдегидрогеназы (AEI90736.1) в *C. autoethanogenum* продемонстрировали с применением двух методик: гомологичной рекомбинации и ClosTron.

[081] *Гомологичная рекомбинация*: Для создания штамма *C. autoethanogenum*, более неспособного производить лактат, была разработана нокаутирующая конструкция для разрушения *ldh* посредством двойной гомологичной рекомбинации. Приблизительно 1 тыс. п.о. гомологичных плеч (SEQ ID №s: 1-2), фланкирующих ген *ldh*, клонировали в плазмиду pMTL85151 (фиг. 1) и результатирующую плазмиду pMTL85151-ldh-ko (SEQ ID №: 3). Стандартные методы рекомбинантных ДНК и молекулярного клонирования известны в данной области техники (Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001; Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology. Wiley, 1987). Геномную ДНК из *C. autoethanogenum* DSM23693 выделяли с применением мини-набора PureLink от Invitrogen согласно инструкции производителя.

[082] Для введения ДНК проводили трансформацию согласно приведенному выше описанию или как описано в WO 2012/053905.

[083] После отбора, колонии подвергали скринингу на интеграции одиночного кроссинговера (Фиг. 2A) и далее на мутантов двойного кроссинговера (фиг. 2B). Случай кроссинговера 3' отметили в клоне 6 (Фиг. 2A) и нокаут гена *ldh* наблюдали при скрининге со внешними фланкирующими праймерами (фиг. 2B). Олигонуклеотиды Og21f (SEQ ID №: 4), Og24r (SEQ ID №: 5), Og35f (SEQ ID №: 6) и Og36r (SEQ ID №: 7) применяли для идентификации делеции в лактатдегидрогеназе при двойном кроссинговере.

[084] Аналогичную стратегию и плазмиду также можно использовать, например, в *C. ljungdahlii* или *C. ragsdalei*. Протокол трансформации описан в данной области техники (WO 2012/053905 Leang, *Applied Environ Microbiol*, 79: 1102-1109, 2013).

[085] *ClosTron*: ClosTron (Heap, J Методы Microbiol, 70: 452-464, 2007), инструмент конструирования интрона, размещенный на веб-сайте ClosTron, применили для конструирования области-мишени 129s из 344 пар оснований (SEQ ID №: 8) и идентификации участка-мишени (SEQ ID №: 9). Область-мишень химически встраивали в вектор pMTL007C-E2, содержащий ретро-транспонированный активированный маркер ermB (RAM), при помощи ДНК2.0 (Menlo Park) (SEQ ID №: 12).

[086] Векторы вводили в *C. autoethanogenum* согласно описанию в WO 2012/053905. Одиночные колонии, выросшие на PETC MES с 15 мкг/мл тиамфеникола, высевали штрихом на PETC MES с 5 мкг/мл кларитромицина. Колонии из каждой мишени отбирали случайным образом и подвергали скринингу на вставки с применением фланкирующих праймеров 155F (SEQ ID №: 4) и 939R (SEQ ID №: 5). Амплификацию проводили с применением готовой смеси для ПЦР iNtron Maxime. Продукт ПЦР из 100 пар оснований указал на генотип дикого типа, в то время как размер продукта из приблизительно 1,9 тыс. п.о., дает основание предположить о вставке интрона группы II в участок-мишень (фиг. 3). Потерю плазмиды проверяли путем амплификации маркера устойчивости (*catP*) и грамположительной точки начала репликации (pCB102) (фиг. 4).

Номер последовательности SEQ ID №	Описание
1	левое гомологичное плечо для нарушения гена лактатдегидрогеназы
2	правое гомологичное плечо для нарушения гена лактатдегидрогеназы
3	плазмида pMTL85151-ldh-ko
4	олигонуклеотид Og21f
5	олигонуклеотид Og24r
6	олигонуклеотид Og35f
7	олигонуклеотид Og35f
8	область-мишень ClosTron

9	участок-мишеньClosTron
10	олигонуклеотид fD1
11	олигонуклеотид rP2
12	ClosTron плазмида pMTL007C-E2-ldh::129s

[087] Аналогичную стратегию и плазмиду также можно использовать в *C. ljungdahlii* или *C. Ragsdalei.* Протокол трансформации описан в данной области техники (WO 2012/053905; Leang, Appl Environ Microbiol, 79: 1102-1109, 2013).

Пример 3

[088] Данный пример описывает эксперименты по росту, сравнивая профили продукта штаммов *C. autoethanogenum* с инактивированной лактатдегидрогеназой относительно немодифицированного *C. autoethanogenum*.

[089] Культуры *C. autoethanogenum* и штамма *C. autoethanogenum* с инактивированной лактатдегидрогеназой выращивали на среде PETC с 10 г/л MES буфера в бутылях для сыворотки. Посевной материал составлял 10% от объема среды и объем среды составлял 10 мл. Культуры насыщали отработанным газом с металлургического производства (44% CO, 22% CO_2, 2% H_2, 32% N_2) под давлением в 30 фунтов на квадратный дюйм и инкубировали при 37 °C. pH среды составлял 5,7.

[090] В течение периода роста, отбирали образцы для измерения ОП600 и анализа при помощи ВЭЖХ. Бутыли ежедневно насыщали газом с металлургического производства под давлением 30 фунтов на квадратный дюйм. Эксперимент проводили в трех повторностях.

[091] В то время как немодифицированный штамм *C. autoethanogenum* продуцировал 0,263 ± 0,041 г/л лактата после 6 дней роста (фиг. 5A), то штамм *C. autoethanogenum* с инактивированной лактатдегидрогеназой не продуцировал лактат после 6 дней роста (фиг. 5B). Кроме того, штамм *C. autoethanogenum* с инактивированной лактатдегидрогеназой продуцировал увеличенное количество ацетата, этанола и 2,3-бутандиола. С другой стороны, два штамма обладали схожими профилями роста и достигали схожей ОП600нм, соответствующей 2,69 и 2,365, соответственно.

[092] Все ссылки, включая публикации, заявки на патент и патенты, процитированные в настоящем описании, включены в настоящую заявку посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая ссылка была индивидуально и конкретно была бы включена посредством ссылки и была бы

полностью изложена в настоящей заявке. Ссылка на любой предшествующий уровень области техники в данном описании не является, и не должна быть воспринята как подтверждение того, что предшествующий уровень области техники является составной частью общего знания в области деятельности в любой стране.

[093] Использование терминов "форм единственного числа" и других похожих ссылок в контексте описания настоящего изобретения (особенно в контексте последующей формулы изобретения) должны толковаться как охватывающие как единственное, так и множественное число, если в настоящей заявке не указано иное или явно не противоречит контексту. Термины "содержащий", "имеющий", "включающий в себя" и "содержащий" следует истолковывать как открытые термины (т.е. означающие "включающий, но не ограничивающийся этим"), если не указано иное. Указание диапазонов значений в настоящей заявке всего лишь предназначено для использования в качестве условно-сокращенного способа ссылки индивидуально на каждую отдельную величину, лежащую внутри диапазона, если в настоящей заявке не указано иное, и каждое отдельное значение включено в описание, как если бы оно было индивидуально указано в настоящей заявке. Все описанные в настоящей заявке способы могут быть выполнены в любом подходящем порядке, если в настоящей заявке не указано иное или иное явно противоречит контексту. Применение любого и всех примеров или иллюстрирующих слов (например, "такой как"), предложенных в настоящей заявке, предназначено только для лучшего освещения изобретения и не накладывает ограничений на объем изобретения, если не заявлено иное. Ни одно из иллюстрирующих слов в описании не должно быть истолковано как указание на какой-либо незаявленный элемент в качестве существенного для практического осуществления изобретения.

[094] Предпочтительные варианты реализации настоящего изобретения описаны в настоящей заявке, включая наилучший способ, известный изобретателям, для осуществления изобретения. Варианты данных предпочтительных вариантов реализации могут стать очевидными для специалистов в данной области техники после прочтения приведенного выше описания. Авторы изобретения ожидают, что квалифицированные специалисты реализуют такие подходящие варианты, и авторы изобретения предполагают, что изобретение возможно осуществить на практике иным способом, нежели чем конкретно описано в настоящей заявке. Соответственно, данное изобретение включает все модификации и эквиваленты объекта изобретения, изложенного в формуле изобретения, прилагаемой к настоящему документу, в соответствии с действующим законодательством. Более того, любое сочетание вышеописанных элементов во всех их возможных вариантах

охватывается изобретением, если в настоящей заявке не указано иное или иным образом явно не противоречит контексту.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> LanzaTech New Zealand Limited
Nagaraju, Shilpa
Al-Sinawi, Bakir
De Tissera, Sashini
Koepke, Michael

<120> РЕКОМБИНАНТНЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

<130> LT102WO1

<150> 61/933,815
<151> 2014-01-30

<150> 61/944,541
<151> 2014-02-25

<160> 12

<170> PatentIn версии 3.5

<210> 1
<211> 1000
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетический

<400> 1
tggtattcta gcttgaaatt tgaacttata catgaaatat aatgacaaaa ttgaaatcac 60

atttaaaaac ttttttaaat aagtcttagc ttggtatttt agaaaacctt aggaacttag 120

atatgtttga ggtacgagtt gatctaagtt cctttaggtt ttcaaaatac caagctttag 180

acttattaaa agtttttata gtgatgaaat ttgtcattat atgatattgt ataagtgaac 240

tttcaaccta gaaatatcta aatgtctaaa attatatctt ctaaacttct ttttggtaca 300

tgatggactt tattctcgtc tctccagtac ttcacatcat tatttgaatc catagcttct 360

ataaccactt gttcctttgg ctttccaaga gctactacca atataatttc atatttttca 420

tccaaattaa gatttgattt taattctttt ttattcacat ttcccagcat acatccgcca 480

aatccttttt ctacagctcc tagtaaaata gtttgagctg ctattccagg atcaaatgat 540

gggcttttac taatagatgt gtcattaagt ataacaacat aaccacttgg tttttcacct 600

tcttcaggtc catcccagtc ctttaaatat cctgcccaac ccaaagtctt aaatattttt 660

tcattattat cttctgtatt tgatataaca tattttagtg gctgcaaatt tgaacctgat 720

gctgataatc tggcaaggtt caccaaatat tttaaagttt ccacagttat tttttcattc 780

tgatagaatc ttctacagga tctatttttt aaaactagtt cttttatcat attcatccct 840

ccaagctaat aacttaatat cattacaatt atcatatctc taaacaaatt gaatatcaat 900

caaatatagt aaatataaag gtaatattga attatatata atgttactat aaaattatat 960

atagtaaata ttattcataa aaaggggggag ctagaataca 1000

<210> 2
<211> 1000
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетический

<400> 2
acaaaagttc ttatgcactc ttctttttt gataaaagaa gagtgcattg attttaatgt 60

ttttttatct tatttataga atatagaaat cttagcaact agacttaaac cataatcaag 120

ttaaaatctt ggtaaatcct ttaaattttc aacatccata acatcagggt cagctactaa 180

atattctcct ccatctttac ctttaaatac gccaactcct tcaattatgt gctcccttgc 240

catcattata gcatgattta aaggaagcac ctcaccattt tcaagtaata catctgtaat 300

cttaccctca tgatctttcc ttactttaat tatttttgaa tttttcatta tatacctcct 360

gattagatat atcattaata tatattttga gagaaaactc aactacttat acaaaatatt 420

tttacattat atttacacaa ttataacttt tgtggttgca attaaagtta taattgaacc 480

aaatcttgtt attgacagta caaaatgcaa gtcatatatt tatccgatga ctacccgctc 540

taatactttc cctcttttcc aagtgggagt aaagagcgga tacgtccctg gataacgatt 600

tttcctaaag gataacgcct tctaagtgct gaagcactaa gaatcctgtt aataagcatc 660

aggtggagtt aaacctccat ctgatactaa gaactctgtt tataacatga tttgcaaata 720

tatcactttg gaggaatttt atgaaaaaaa atattattaa aagttccata gtatttatgg 780

tgatttttgc tttatttttt atagcatcag ataaatcaac tgttcatgca ttaaattgct 840

atacagtaag cttgtcaaat tttaaagagg tatcccaaaa catttatgta cagccaaata 900

cttctgataa agatataaat aatatattga gtaccatttc caaatctaaa aacattgtgg 960

ccaatttata tggaagtttc aatgctaaac ctgtctttat 1000

<210> 3
<211> 4746
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетический

<400> 3
cctgcaggtt aagagcaaca ctgtacgtgg tattctagct tgaaatttga acttatacat 60

gaaatataat gacaaaattg aaatcacatt taaaaacttt tttaaataag tcttagcttg 120

gtattttaga aaaccttagg aacttagata tgtttgaggt acgagttgat ctaagttcct 180

ttaggttttc aaaataccaa gctttagact tattaaaagt ttttatagtg atgaaatttg 240

tcattatatg atattgtata agtgaacttt caacctagaa atatctaaat gtctaaaatt 300

atatcttcta aacttctttt tggtacatga tggactttat tctcgtctct ccagtacttc 360

acatcattat ttgaatccat agcttctata accacttgtt cctttggctt tccaagagct 420

actaccaata taatttcata tttttcatcc aaattaagat ttgattttaa ttctttttta 480

ttcacatttc ccagcataca tccgccaaat ccttttttcta cagctcctag taaaatagtt 540

tgagctgcta ttccaggatc aaatgatggg cttttactaa tagatgtgtc attaagtata 600

acaacataac cacttggttt ttcaccttct tcaggtccat cccagtcctt taaatatcct 660

gcccaaccca aagtcttaaa tatttttca ttattatctt ctgtatttga tataacatat 720

tttagtggct gcaaatttga acctgatgct gataatctgg caaggttcac caaatatttt 780

aaagtttcca cagttatttt ttcattctga tagaatcttc tacaggatct atttttaaa 840

actagttctt ttatcatatt catccctcca agctaataac ttaatatcat tacaattatc 900

atatctctaa acaaattgaa tatcaatcaa atatagtaaa tataaaggta atattgaatt 960

atatataatg ttactataaa attatatata gtaaatatta ttcataaaaa gggggagcta 1020

gaatacaatg aaagtgctag cgaaggcaaa gaaaatccat ggcaaattga ataaacaaaa 1080

gttcttatgc actcttcttt ttttgataaa agaagagtgc attgatttta atgttttttt 1140

atcttattta tagaatatag aaatcttagc aactagactt aaaccataat caagttaaaa 1200

tcttggtaaa tcctttaaat tttcaacatc cataacatca gggtcagcta ctaaatattc 1260

tcctccatct ttacctttaa atacgccaac tccttcaatt atgtgctccc ttgccatcat 1320

tatagcatga tttaaaggaa gcacctcacc attttcaagt aatacatctg taatcttacc 1380

ctcatgatct ttccttactt taattatttt tgaatttttc attatatacc tcctgattag 1440

atatatcatt aatatatatt ttgagagaaa actcaactac ttatacaaaa tatttttaca 1500

ttatatttac acaattataa cttttgtggt tgcaattaaa gttataattg aaccaaatct 1560

tgttattgac agtacaaaat gcaagtcata tatttatccg atgactaccc gctctaatac 1620

tttccctctt ttccaagtgg gagtaaagag cggatacgtc cctggataac gatttttcct 1680

aaaggataac gccttctaag tgctgaagca ctaagaatcc tgttaataag catcaggtgg 1740

agttaaacct ccatctgata ctaagaactc tgtttataac atgatttgca aatatatcac 1800

tttggaggaa ttttatgaaa aaaaatatta ttaaaagttc catagtattt atggtgattt 1860

ttgctttatt ttttatagca tcagataaat caactgttca tgcattaaat tgctatacag 1920

taagcttgtc aaattttaaa gaggtatccc aaaacattta tgtacagcca aatacttctg 1980

ataaagatat aaataatata ttgagtacca tttccaaatc taaaaacatt gtggccaatt 2040

tatatggaag tttcaatgct aaacctgtct ttataattag caaagattca acagccttaa 2100

aaaaatttgg tgttgaaaat aaaacaggag ctacacaaaa aactatacta ggtagctaca 2160

tagttctggg accagaggga ttaaatcggc gcgccgcatt cacttctttt ctatataaat 2220

atgagcgaag cgaataagcg tcggaaaagc agcaaaaagt ttccttttg ctgttggagc 2280

atgggggttc agggggtgca gtatctgacg tcaatgccga gcgaaagcga gccgaagggt 2340

agcatttacg ttagataacc ccctgatatg ctccgacgct ttatatagaa aagaagattc 2400

aactaggtaa aatcttaata taggttgaga tgataaggtt tataaggaat ttgtttgttc 2460

taatttttca ctcattttgt tctaatttct tttaacaaat gttctttttt ttttagaaca 2520

gttatgatat agttagaata gtttaaaata aggagtgaga aaaagatgaa agaaagatat 2580

ggaacagtct ataaaggctc tcagaggctc atagacgaag aaagtggaga agtcatagag 2640

gtagacaagt tataccgtaa acaaacgtct ggtaacttcg taaaggcata tatagtgcaa 2700

ttaataagta tgttagatat gattggcgga aaaaaactta aaatcgttaa ctatatccta 2760

gataatgtcc acttaagtaa caatacaatg atagctacaa caagagaaat agcaaaagct 2820

acaggaacaa gtctacaaac agtaataaca acacttaaaa tcttagaaga aggaaatatt 2880

ataaaaagaa aaactggagt attaatgtta aaccctgaac tactaatgag aggcgacgac 2940

caaaaacaaa aatacctctt actcgaattt gggaactttg agcaagaggc aaatgaaata 3000

gattgacctc ccaataacac cacgtagtta ttgggaggtc aatctatgaa atgcgattaa 3060

gggccggcca gtgggcaagt tgaaaaattc acaaaaatgt ggtataatat ctttgttcat 3120

tagagcgata aacttgaatt tgagagggaa cttagatggt atttgaaaaa attgataaaa 3180

atagttggaa cagaaaagag tattttgacc actactttgc aagtgtacct tgtacctaca 3240

gcatgaccgt taaagtggat atcacacaaa taaaggaaaa gggaatgaaa ctatatcctg 3300

caatgcttta ttatattgca atgattgtaa accgccattc agagtttagg acggcaatca 3360

atcaagatgg tgaattgggg atatatgatg agatgatacc aagctataca atatttcaca 3420

atgatactga aacattttcc agcctttgga ctgagtgtaa gtctgacttt aaatcatttt 3480

tagcagatta tgaaagtgat acgcaacggt atggaaacaa tcatagaatg gaaggaaagc 3540

caaatgctcc ggaaaacatt tttaatgtat ctatgatacc gtggtcaacc ttcgatggct 3600

ttaatctgaa tttgcagaaa ggatatgatt atttgattcc tatttttact atggggaaat 3660

attataaaga agataacaaa attatacttc ctttggcaat tcaagttcat cacgcagtat 3720

gtgacggatt tcacatttgc cgttttgtaa acgaattgca ggaattgata aatagttaac 3780

ttcaggtttg tctgtaacta aaaacaagta tttaagcaaa aacatcgtag aaatacggtg 3840

ttttttgtta ccctaagttt aaactccttt ttgataatct catgaccaaa atcccttaac 3900

gtgagttttc gttccactga gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga tcttcttgag 3960

atccttttttt tctgcgcgta atctgctgct tgcaaacaaa aaaaccaccg ctaccagcgg 4020

tggtttgttt gccggatcaa gagctaccaa ctctttttcc gaaggtaact ggcttcagca 4080

gagcgcagat accaaatact gttcttctag tgtagccgta gttaggccac cacttcaaga 4140

actctgtagc accgcctaca tacctcgctc tgctaatcct gttaccagtg gctgctgcca 4200

gtggcgataa gtcgtgtctt accgggttgg actcaagacg atagttaccg gataaggcgc 4260

agcggtcggg ctgaacgggg ggttcgtgca cacagcccag cttggagcga acgacctaca 4320

ccgaactgag atacctacag cgtgagctat gagaaagcgc cacgcttccc gaagggagaa 4380

aggcggacag gtatccggta agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg agggagcttc 4440

caggggaaa cgcctggtat ctttatagtc ctgtcgggtt tcgccacctc tgacttgagc 4500

gtcgattttt gtgatgctcg tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg 4560

ccttttacg gttcctggcc ttttgctggc cttttgctca catgttcttt cctgcgttat 4620

cccctgattc tgtggataac cgtattaccg cctttgagtg agctgatacc gctcgccgca 4680

gccgaacgac cgagcgcagc gagtcagtga gcgaggaagc ggaagagcgc ccaatacgca 4740

gggccc 4746

<210> 4
<211> 39
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетический

<400> 4
attcatcctg caggttaaga gcaacactgt acgtggtat 39

<210> 5
<211> 37
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетический

<400> 5
gactggcgcg ccatttaatc cctctggtcc cagaact 37

<210> 6
<211> 25
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетический

<400> 6
tgaactaaaa agtttcgtac gatgt 25

<210> 7
<211> 25
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетический

<400> 7
tcctttatcc attgtccctc agagt 25

<210> 8
<211> 309
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетический

<400> 8
ttatccttag acttcgccaa ggtgcgccca gatagggtgt taagtcaagt agtttaaggt 60

actactctgt aagataacac agaaaacagc caacctaacc gaaaagcgaa agctgatacg 120

ggaacagagc acggttggaa agcgatgagt tacctaaaga caatcgggta cgactgagtc 180

gcaatgttaa tcagatataa ggtataagtt gtgtttactg aacgcaagtt tctaatttcg 240

attaagtctc gatagaggaa agtgtctgaa acctctagta caaagaaagg taagttaccc 300

ttggcgact 309

<210> 9
<211> 45
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетический

<400> 9
ccaactatgg aaaatgcaga cttggccaag ggatttgact gcatc 45

<210> 10
<211> 37
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетический

<400> 10
ccgaattcgt cgacaacaga gtttgatcct ggctcag 37

<210> 11
<211> 37
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетический

<400> 11
cccgggatcc aagcttacgg ctaccttgtt acgactt 37

<210> 12
<211> 9034
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетический

<400> 12
agaaggccat cctgacggat ggccttttg cgtttctaca aactcttcct gtcgtcatat 60

ctacaagcca tccccccaca gatacgggcg cgccgccatt atttttttga acaattgaca 120

attcatttct tatttttat taagtgatag tcaaaaggca taacagtgct gaatagaaag 180

aaatttacag aaaagaaaat tatagaattt agtatgatta attatactca tttatgaatg 240

tttaattgaa tacaaaaaaa aatacttgtt atgtattcaa ttacgggtta aaatatagac 300

aagttgaaaa atttaataaa aaaataagtc ctcagctctt atatattaag ctaccaactt 360

agtatataag ccaaaactta aatgtgctac caacacatca agccgttaga gaactctatc 420

tatagcaata tttcaaatgt accgacatac aagagaaaca ttaactatat atattcaatt 480

tatgagatta tcttaacaga tataaatgta aattgcaata agtaagattt agaagtttat 540

agcctttgtg tattggaagc agtacgcaaa ggctttttta tttgataaaa attagaagta 600

tatttatttt ttcataatta atttatgaaa atgaaagggg gtgagcaaag tgacagagga 660

aagcagtatc ttatcaaata acaaggtatt agcaatatca ttattgactt tagcagtaaa 720

cattatgact tttatagtgc ttgtagctaa gtagtacgaa agggggagct ttaaaaagct 780

ccttggaata catagaattc ataaattaat ttatgaaaag aagggcgtat atgaaaactt 840

gtaaaaattg caaagagttt attaaagata ctgaaatatg caaaatacat tcgttgatga 900

ttcatgataa aacagtagca acctattgca gtaaatacaa tgagtcaaga tgtttacata 960

aagggaaagt ccaatgtatt aattgttcaa agatgaaccg atatggatgg tgtgccataa 1020

aaatgagatg ttttacagag gaagaacaga aaaaagaacg tacatgcatt aaatattatg 1080

caaggagctt taaaaaagct catgtaaaga agagtaaaaa gaaaaaataa tttatttatt 1140

aatttaatat tgagagtgcc gacacagtat gcactaaaaa atatatctgt ggtgtagtga 1200

gccgatacaa aaggatagtc actcgcattt tcataataca tcttatgtta tgattatgtg 1260

tcggtgggac ttcacgacga aaacccacaa taaaaaaaga gttcggggta gggttaagca 1320

tagttgaggc aactaaacaa tcaagctagg atatgcagta gcagaccgta aggtcgttgt 1380

ttaggtgtgt tgtaatacat acgctattaa gatgtaaaaa tacggatacc aatgaaggga 1440

aaagtataat ttttggatgt agtttgtttg ttcatctatg ggcaaactac gtccaaagcc 1500

gtttccaaat ctgctaaaaa gtatatcctt tctaaaatca aagtcaagta tgaaatcata 1560

aataaagttt aattttgaag ttattatgat attatgtttt tctattaaaa taaattaagt 1620

atatagaata gtttaataat agtatatact taatgtgata agtgtctgac agtgtcacag 1680

aaaggatgat tgttatggat tataagcggc cggccagtgg gcaagttgaa aaattcacaa 1740

aaatgtggta taatatcttt gttcattaga gcgataaact tgaatttgag agggaactta 1800

gatggtattt gaaaaaattg ataaaaatag ttggaacaga aaagagtatt ttgaccacta 1860

ctttgcaagt gtaccttgta cctacagcat gaccgttaaa gtggatatca cacaaataaa 1920

ggaaaaggga atgaaactat atcctgcaat gctttattat attgcaatga ttgtaaaccg 1980

ccattcagag tttaggacgg caatcaatca agatggtgaa ttggggatat atgatgagat 2040

gataccaagc tatacaatat ttcacaatga tactgaaaca ttttccagcc tttggactga 2100

gtgtaagtct gactttaaat cattttagc agattatgaa agtgatacgc aacggtatgg 2160

aaacaatcat agaatggaag gaaagccaaa tgctccggaa aacattttta atgtatctat 2220

gataccgtgg tcaaccttcg atggctttaa tctgaatttg cagaaaggat atgattattt 2280

gattcctatt tttactatgg ggaaatatta taaagaagat aacaaaatta tacttccttt 2340

ggcaattcaa gttcatcacg cagtatgtga cggatttcac atttgccgtt ttgtaaacga 2400

attgcaggaa ttgataaata gttaacttca ggtttgtctg taactaaaaa caagtattta 2460

agcaaaaaca tcgtagaaat acggtgtttt ttgttaccct aagtttaaac tccttttga 2520

taatctcatg accaaaatcc cttaacgtga gttttcgttc cactgagcgt cagaccccgt 2580

agaaaagatc aaaggatctt cttgagatcc ttttttttctg cgcgtaatct gctgcttgca 2640

aacaaaaaaa ccaccgctac cagcggtggt ttgtttgccg gatcaagagc taccaactct 2700

ttttccgaag gtaactggct tcagcagagc gcagatacca aatactgtcc ttctagtgta 2760

gccgtagtta ggccaccact tcaagaactc tgtagcaccg cctacatacc tcgctctgct 2820

aatcctgtta ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtcg tgtcttaccg ggttggactc 2880

aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg gtcgggctga acgggggggtt cgtgcacaca 2940

gcccagcttg gagcgaacga cctacaccga actgagatac ctacagcgtg agcattgaga 3000

aagcgccacg cttcccgaag ggagaaaggc ggacaggtat ccggtaagcg gcagggtcgg 3060

aacaggagag cgcacgaggg agcttccagg gggaaacgcc tggtatcttt atagtcctgt 3120

cgggtttcgc cacctctgac ttgagcgtcg atttttgtga tgctcgtcag gggggcggag 3180

cctatggaaa aacgccagca acgcggcctt tttacggttc ctggccttttt gctggccttt 3240

tgctcacatg ttctttcctg cgttatcccc tgattctgtg gataaccgta ttaccgcctt 3300

tgagtgagct gataccgctc gccgcagccg aacgaccgag cgcagcgagt cagtgagcga 3360

ggaagcggaa gagcgcccaa tacgcagggc cccctgcttc ggggtcatta tagcgatttt 3420

ttcggtatat ccatcctttt tcgcacgata tacaggattt tgccaaaggg ttcgtgtaga 3480

ctttccttgg tgtatccaac ggcgtcagcc gggcaggata ggtgaagtag gcccacccgc 3540

gagcgggtgt tccttcttca ctgtccctta ttcgcacctg gcggtgctca acgggaatcc 3600

tgctctgcga ggctggccgg ctaccgccgg cgtaacagat gagggcaagc ggatggctga 3660

tgaaaccaag ccaaccagga agggcagccc acctatcaag gtgtactgcc ttccagacga 3720

acgaagagcg attgaggaaa aggcggcggc ggccggcatg agcctgtcgg cctacctgct 3780

ggccgtcggc cagggctaca aaatcacggg cgtcgtggac tatgagcacg tccgcgagct 3840

ggcccgcatc aatggcgacc tgggccgcct gggcggcctg ctgaaactct ggctcaccga 3900

cgacccgcgc acggcgcggt tcggtgatgc cacgatcctc gccctgctgg cgaagatcga 3960

agagaagcag gacgagcttg gcaaggtcat gatgggcgtg gtccgcccga gggcagagcc 4020

atgacttttt tagccgctaa aacggccggg gggtgcgcgt gattgccaag cacgtcccca 4080

tgcgctccat caagaagagc gacttcgcgg agctggtgaa gtacatcacc gacgagcaag 4140

gcaagaccga tcgggccccc tgcagggtgt agtagcctgt gaaataagta aggaaaaaaa 4200

agaagtaagt gttatatatg atgattattt tgtagatgta gataggataa tagaatccat 4260

agaaaatata ggttatacag ttatataaaa attactttaa aaattaataa aaacatggta 4320

aaatataaat cgtataaagt tgtgtaattt ttaagcttta taattatcct tagacttcgc 4380

caaggtgcgc ccagataggg tgttaagtca agtagtttaa ggtactactc tgtaagataa 4440

cacagaaaac agccaaccta accgaaaagc gaaagctgat acgggaacag agcacggttg 4500

gaaagcgatg agttacctaa agacaatcgg gtacgactga gtcgcaatgt taatcagata 4560

taaggtataa gttgtgttta ctgaacgcaa gtttctaatt tcgattaagt ctcgatagag 4620

gaaagtgtct gaaacctcta gtacaaagaa aggtaagtta cccttggcga cttatctgtt 4680

atcaccacat ttgtacaatc tgtaggagaa cctatgggaa cgaaacgaaa gcgatgccga 4740

gaatctgaat ttaccaagac ttaacactaa ctggggatac cctaaacaag aatgcctaat 4800

agaaaggagg aaaaaggcta tagcactaga gcttgaaaat cttgcaaggg tacggagtac 4860

tcgtagtagt ctgagaaggg taacgccctt tacatggcaa aggggtacag ttattgtgta 4920

ctaaaattaa aaattgatta gggaggaaaa cctcaaaatg aaaccaacaa tggcaatttt 4980

agaaagaatc agtaaaaatt cacaagaaaa tatagacgaa gtttttacaa gactttatcg 5040

ttatctttta cgtccagata tttattacgt ggcgacgcgt gaagttccta tactttctag 5100

agaataggaa cttcgcgact catagaatta tttcctcccg ttaaataata gataactatt 5160

aaaaatagac aatacttgct cataagtaac ggtacttaaa ttgtttactt tggcgtgttt 5220

cattgcttga tgaaactgat ttttagtaaa cagttgacga tattctcgat tgacccattt 5280

tgaaacaaag tacgtatata gcttccaata tttatctgga acatctgtgg tatggcgggt 5340

aagttttatt aagacactgt ttacttttgg tttaggatga aagcattccg ctggcagctt 5400

aagcaattgc tgaatcgaga cttgagtgtg caagagcaac cctagtgttc ggtgaatatc 5460

caaggtacgc ttgtagaatc cttcttcaac aatcagatag atgtcagacg catggctttc 5520

aaaaaccact tttttaataa tttgtgtgct taaatggtaa ggaatactcc caacaatttt 5580

atacctctgt ttgttaggga attgaaactg tagaatatct tggtgaatta aagtgacacg 5640

agtattcagt tttaattttt ctgacgataa gttgaataga tgactgtcta attcaataga 5700

cgttacctgt ttacttattt tagccagttt cgtcgttaaa tgccctttac ctgttccaat 5760

ttcgtaaacg gtatcggttt cttttaaatt caattgtttt attatttggt tgagtacttt 5820

ttcactcgtt aaaaagtttt gagaatattt tatatttttg ttcataccag caccagaagc 5880

accagcatct cttgggttaa ttgaggcctg agtataaggt gacttatact tgtaatctat 5940

ctaaacgggg aacctctcta gtagacaatc ccgtgctaaa ttgtaggact gccctttaat 6000

aaatacttct atatttaaag aggtatttat gaaaagcgga atttatcaga ttaaaaatac 6060

tttctctaga gaaaatttcg tctggattag ttacttatcg tgtaaaatct gataaatgga 6120

attggttcta cataaatgcc taacgactat ccctttgggg agtagggtca agtgactcga 6180

aacgatagac aacttgcttt aacaagttgg agatatagtc tgctctgcat ggtgacatgc 6240

agctggatat aattccgggg taagattaac gaccttatct gaacataatg ccatatgaat 6300

ccctcctaat ttatacgttt tctctaacaa cttaattata cccactatta ttatttttat 6360

caatatagaa gttcctatac tttctagaga ataggaactt cacgcgttgg gaaatggcaa 6420

tgatagcgaa acaacgtaaa actcttgttg tatgctttca ttgtcatcgt cacgtgattc 6480

ataaacacaa gtgaatgtcg acagtgaatt tttacgaacg aacaataaca gagccgtata 6540

ctccgagagg ggtacgtacg gttcccgaag agggtggtgc aaaccagtca cagtaatgtg 6600

aacaaggcgg tacctcccta cttcaccata tcattttctg cagccccta gaaataattt 6660

tgtttaactt taagaaggag atatacatat atggctagat cgtccattcc gacagcatcg 6720

ccagtcacta tggcgtgctg ctagcgctat atgcgttgat gcaatttcta tgcactcgta 6780

gtagtctgag aagggtaacg ccctttacat ggcaaagggg tacagttatt gtgtactaaa 6840

attaaaaatt gattagggag gaaaacctca aaatgaaacc aacaatggca attttagaaa 6900

gaatcagtaa aaattcacaa gaaaatatag acgaagtttt tacaagactt tatcgttatc 6960

ttttacgtcc agatatttat tacgtggcgt atcaaaattt atattccaat aaaggagctt 7020

ccacaaaagg aatattagat gatacagcgg atggctttag tgaagaaaaa ataaaaaaga 7080

ttattcaatc tttaaaagac ggaacttact atcctcaacc tgtacgaaga atgtatattg 7140

caaaaaagaa ttctaaaaag atgagacctt taggaattcc aactttcaca gataaattga 7200

tccaagaagc tgtgagaata attcttgaat ctatctatga accggtattc gaagatgtgt 7260

ctcacggttt tagacctcaa cgaagctgtc acacagcttt gaaaacaatc aaaagagagt 7320

ttggcggcgc aagatggttt gtggagggag atataaaagg ctgcttcgat aatatagacc 7380

acgttacact cattggactc atcaatctta aaatcaaaga tatgaaaatg agccaattga 7440

tttataaatt tctaaaagca ggttatctgg aaaactggca gtatcacaaa acttacagcg 7500

gaacacctca aggtggaatt ctatctcctc ttttggccaa catctatctt catgaattgg 7560

ataagtttgt tttacaactc aaaatgaagt ttgaccgaga aagtccagaa agaataacac 7620

ctgaatatcg ggagctccac aatgagataa aaagaatttc tcaccgtctc aagaagttgg 7680

agggtgaaga aaaagctaaa gttcttttag aatatcaaga aaaacgtaaa agattaccca 7740

cactcccctg tacctcacag acaaataaag tattgaaata cgtccggtat gcggacgact 7800

tcattatctc tgttaaagga agcaaagagg actgtcaatg gataaaagaa caattaaaac 7860

tttttattca taacaagcta aaaatggaat tgagtgaaga aaaaacactc atcacacata 7920

gcagtcaacc cgctcgtttt ctgggatatg atatacgagt aaggagatct ggaacgataa 7980

aacgatctgg taaagtcaaa aagagaacac tcaatgggag tgtagaactc cttattcctc 8040

ttcaagacaa aattcgtcaa tttatttttg acaagaaaat agctatccaa aagaaagata 8100

gctcatggtt tccagttcac aggaaatatc ttattcgttc aacagactta gaaatcatca 8160

caatttataa ttctgaactc cgcgggattt gtaattacta cggtctagca agtaatttta 8220

accagctcaa ttattttgct tatcttatgg aatacagctg tctaaaaacg atagcctcca 8280

aacataaggg aacactttca aaaaccattt ccatgtttaa agatggaagt ggttcgtggg 8340

ggatcccgta tgagataaag caaggtaagc agcgccgtta ttttgcaaat tttagtgaat 8400

gtaaatcccc ttatcaattt acggatgaga taagtcaagc tcctgtattg tatggctatg 8460

cccggaatac tcttgaaaac aggttaaaag ctaaatgttg tgaattatgt gggacgtctg 8520

atgaaaatac ttcctatgaa attcaccatg tcaataaggt caaaaatctt aaaggcaaag 8580

aaaaatggga aatggcaatg atagcgaaac aacgtaaaac tcttgttgta tgctttcatt 8640

gtcatcgtca cgtgattcat aaacacaagt gaatgtcgag cacccgttct cggagcactg 8700

tccgaccgct ttggccgccg cccagtcctg ctcgcttcgc tacttggagc cactatcgac 8760

tacgcgatca tggcgaccac acccgtcctg tggatcgcca agccgccgat ggtagtgtgg 8820

ggtctcccca tgcgagagta gggaactgcc aggcatcaaa taaaacgaaa ggctcagtcg 8880

aaagactggg cctttcgttt tatctgttgt ttgtcggtga acgctctcct gagtaggaca 8940

aatccgccgg gagcggattt gaacgttgcg aagcaacggc ccggagggtg gcgggcagga 9000

cgcccgccat aaactgccag gcatcaaatt aagc 9034

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Карбокситрофная ацетогенная бактерия, содержащая нарушающую мутацию в ферменте пути биосинтеза лактата.

2. Бактерия по п. 1, отличающаяся тем, что указанная мутация уменьшает или устраняет экспрессию или активность указанного фермента.

3. Бактерия по п. 1, отличающаяся тем, что указанная бактерия продуцирует уменьшенное количество лактата по сравнению с исходной бактерией.

4. Бактерия по п. 1, отличающаяся тем, что указанная бактерия по существу не продуцирует лактат.

5. Бактерия по п. 1, отличающаяся тем, что указанная бактерия продуцирует один или более из этанола, 2,3-бутандиола, формиата, пирувата, сукцината, валина, лейцина, изолейцина, малата, фумарата, 2-оксоглутарата, цитрата и цитрамалата.

6. Бактерия по п. 1, отличающаяся тем, что указанная бактерия продуцирует увеличенное количество одного или более из этанола, 2,3-бутандиола, формиата, пирувата, сукцината, валина, лейцина, изолейцина, малата, фумарата, 2-оксоглутарата, цитрата и цитрамалата по сравнению с исходной бактерией.

7. Бактерия по п. 1, отличающаяся тем, что указанный фермент исходно преобразует пируват в лактат.

8. Бактерия по п. 1, отличающаяся тем, что указанный фермент представляет собой лактатдегидрогеназу (ЛДГ).

9. Бактерия по п. 1, отличающаяся тем, что указанная бактерия происходит из исходной бактерии, выбранной из группы, состоящей из *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* и *Clostridium ragsdalei*.

10. Бактерия по п. 9, отличающаяся тем, что указанная исходная бактерия представляет собой *Clostridium autoethanogenum*, депонированную в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ) под номером доступа DSM23693.

11. Способ получения продукта, включающий культивирование бактерии по п. 1 в присутствии субстрата, содержащего CO, в результате чего указанная бактерия продуцирует продукт.

12. Способ по п. 11, отличающийся тем, что мутация уменьшает или устраняет экспрессию или активность фермента.

13. Способ по п. 11, отличающийся тем, что указанная бактерия продуцирует уменьшенное количество лактата по сравнению с исходной бактерией.

14. Способ по п. 11, отличающийся тем, что указанная бактерия по существу не продуцирует лактат.

15. Способ по п. 11, отличающийся тем, что указанный продукт содержит один или более из этанола, 2,3-бутандиола, формиата, пирувата, сукцината, валина, лейцина, изолейцина, малата, фумарата, 2-оксоглутарата, цитрата и цитрамалата.

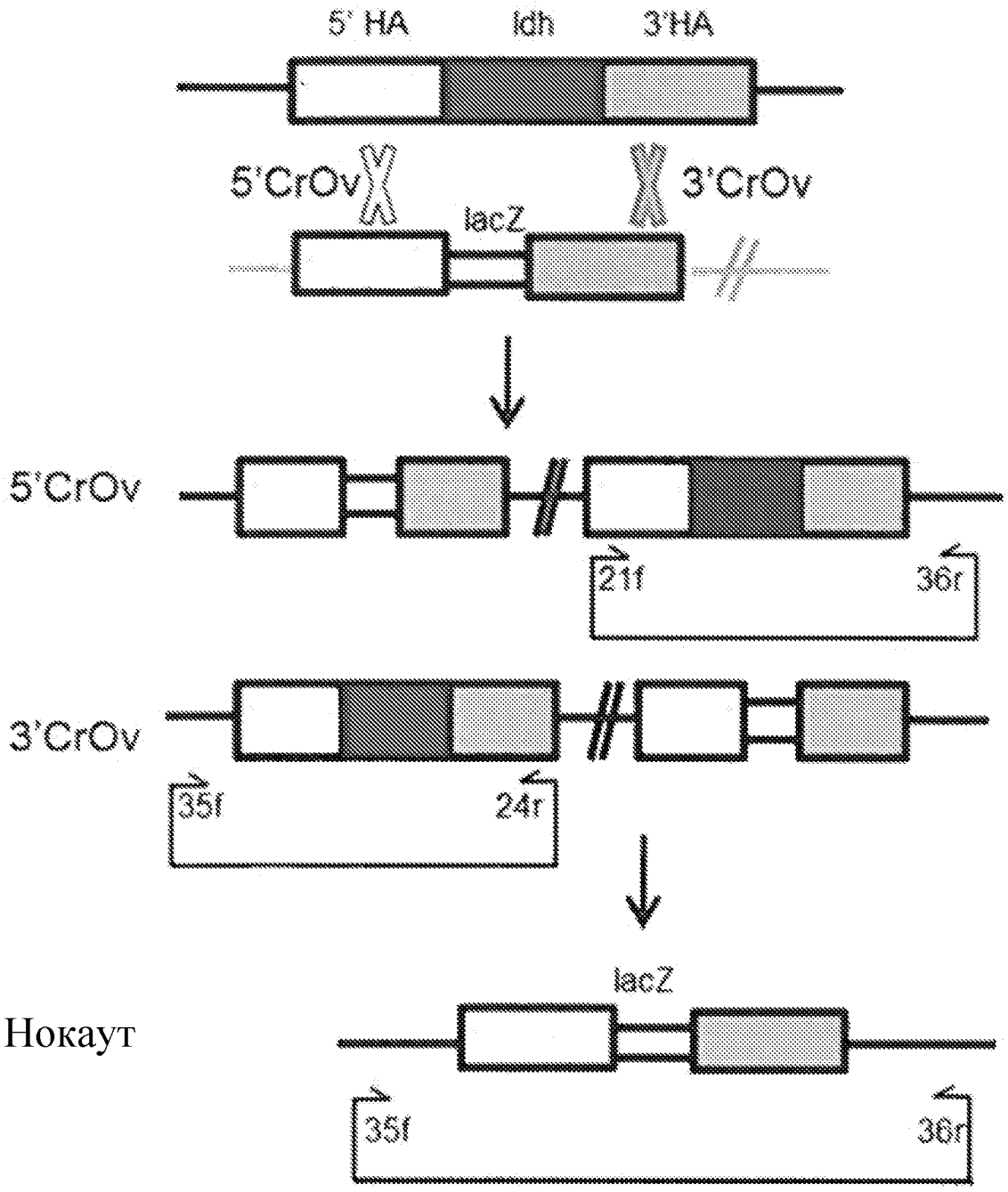
16. Способ по п. 11, отличающийся тем, что указанная бактерия продуцирует увеличенное количество указанного продукта по сравнению с исходной бактерией.

17. Способ по п. 11, отличающийся тем, что указанный фермент исходно преобразует пируват в лактат.

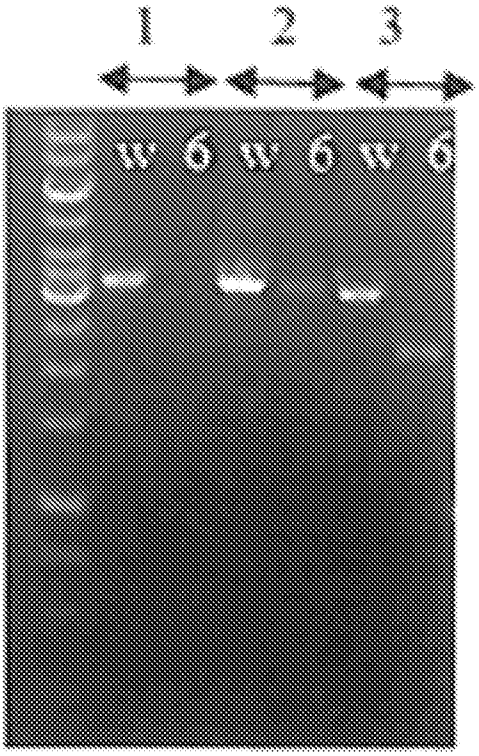
18. Способ по п. 11, отличающийся тем, что указанный фермент представляет собой лактатдегидрогеназу (ЛДГ).

19. Способ по п. 11, отличающийся тем, что указанная бактерия происходит из исходной бактерии, выбранной из группы, состоящей из *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* и *Clostridium ragsdalei*.

20. Способ по п. 19, отличающийся тем, что указанная исходная бактерия представляет собой *Clostridium autoethanogenum*, депонированную в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ) под номером доступа DSM23693.

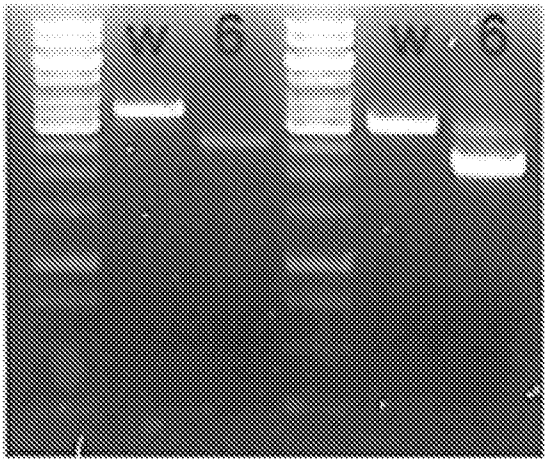

5' HA
ldh
3'HA
5'CrOv
3'CrOv
lacZ
5'CrOv
211
36r
3'CrOv
35r
24r
lacZ
Нокаут
35r
36r

Фиг. 1



1) Og35f/Og36r
2) Og24r/Og35f
3) Og21f/Og36r

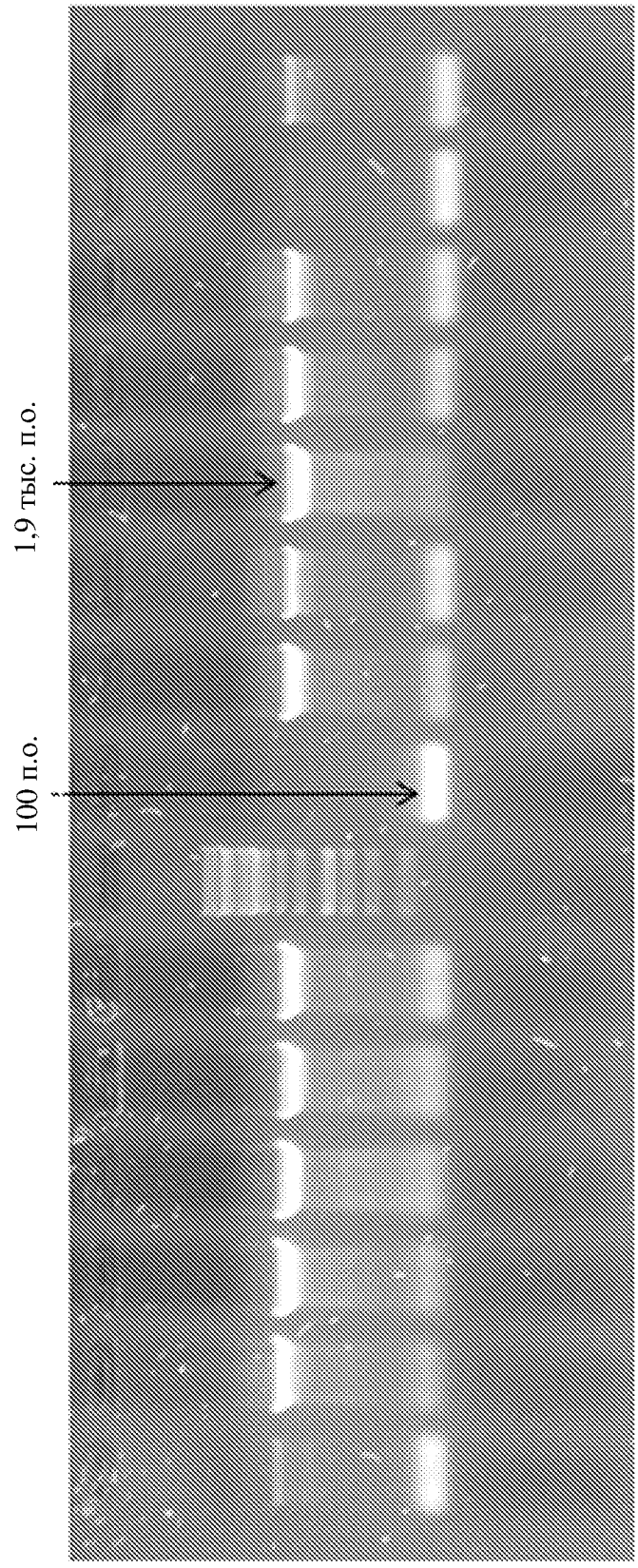
4) Дикий тип (w)
5) 6 = клон 6



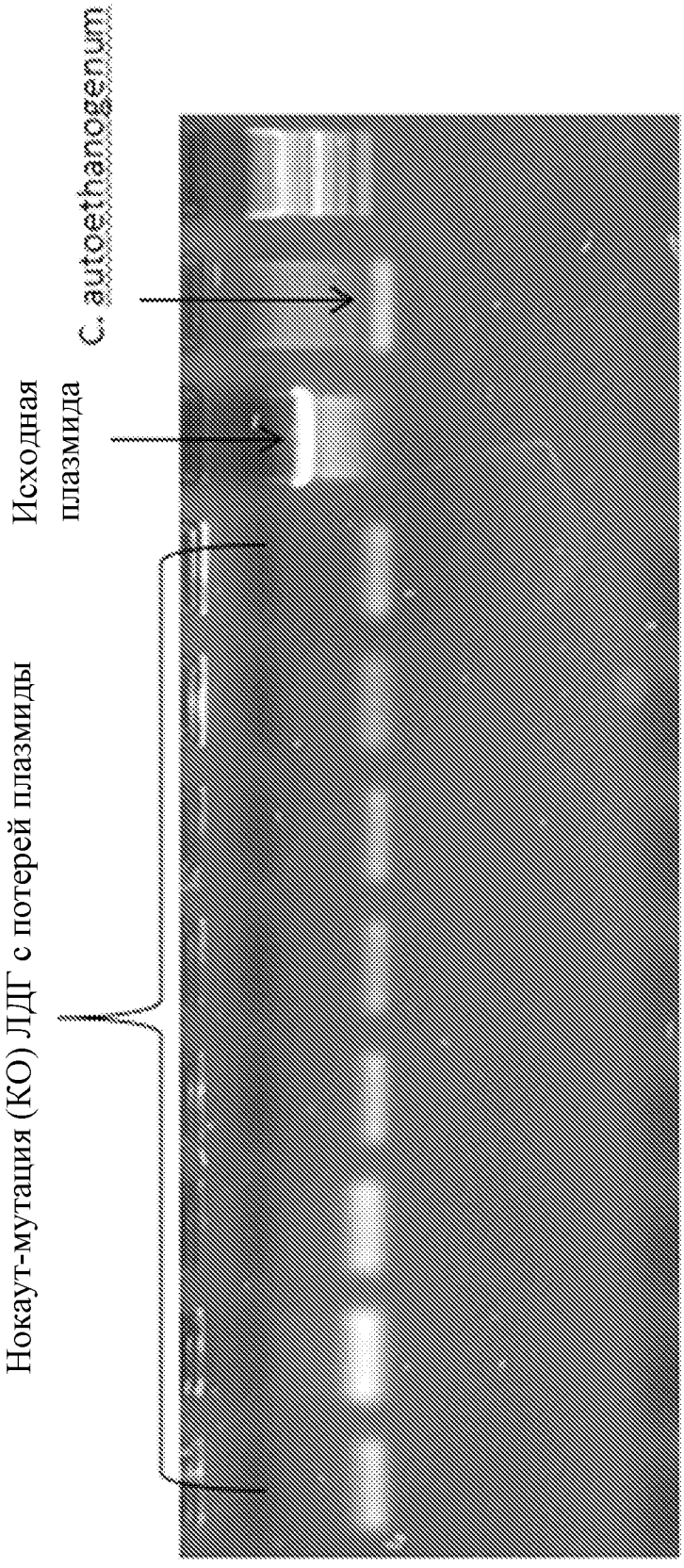
1) Og35f/Og36r
2) Og21f/Og24r

1) Дикий тип (w)
2) 6 = клон 6

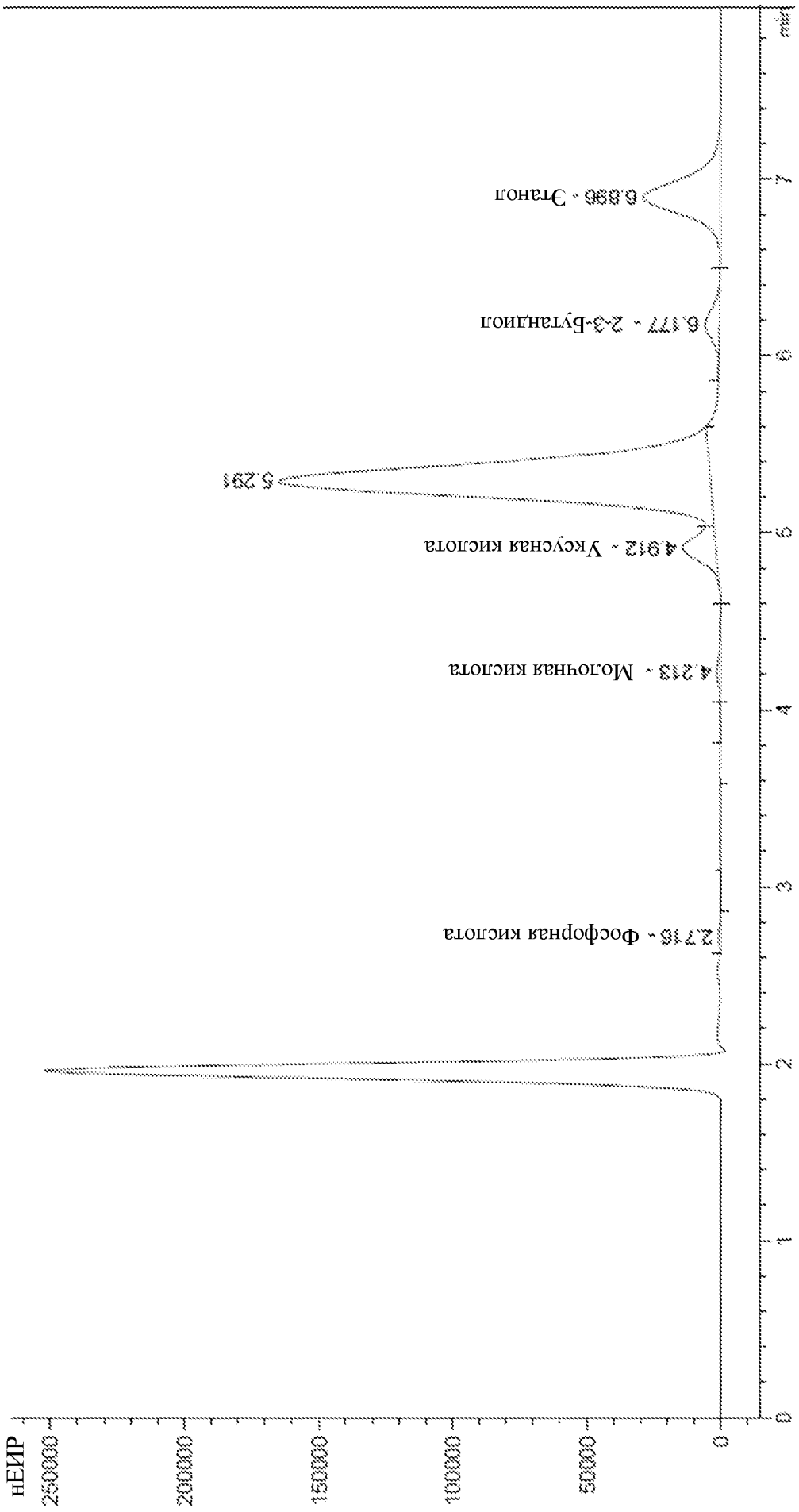
Фиг. 2



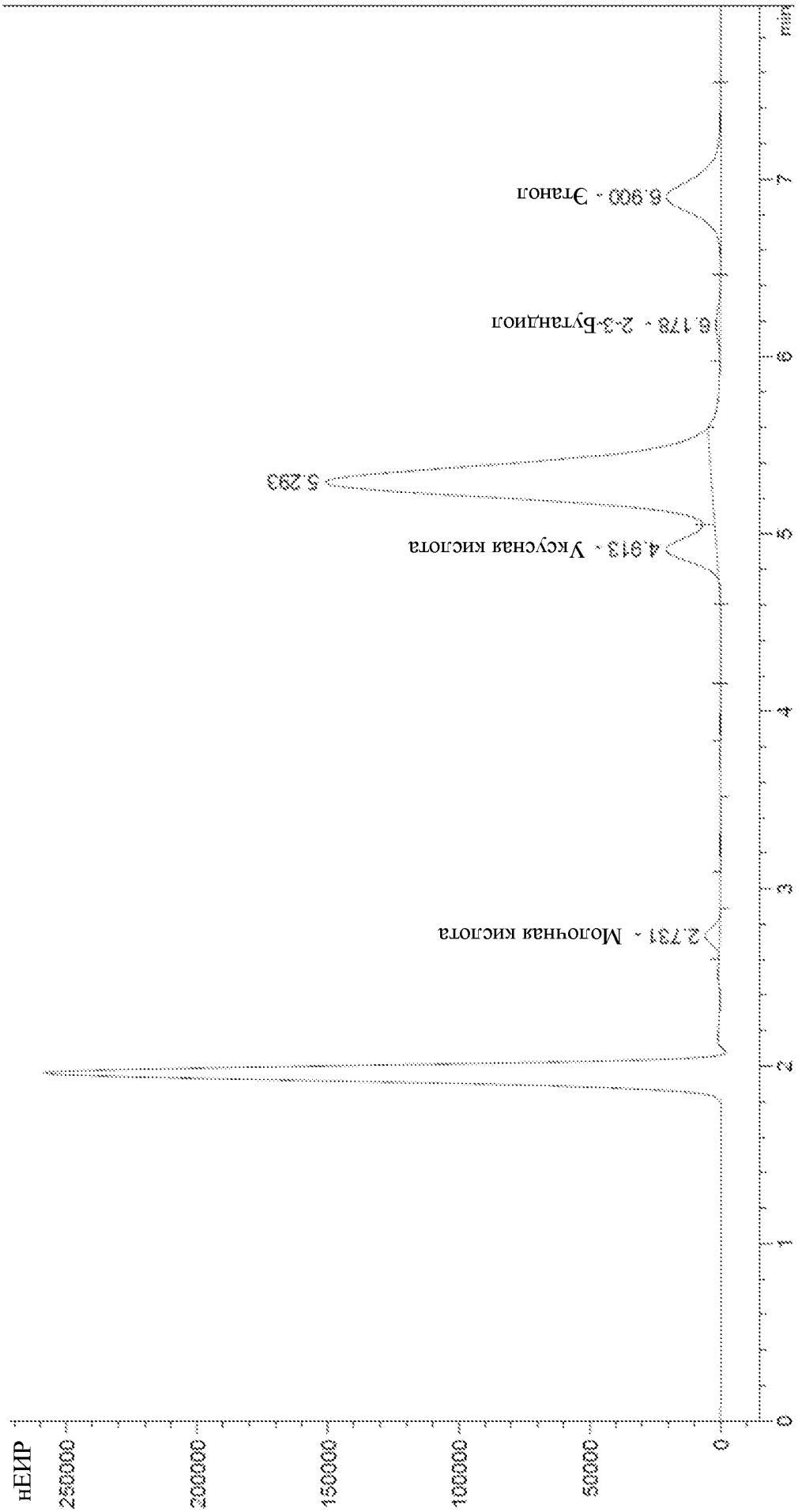
Фиг. 3


C. autoethanogenum
Исходная плазмида
Нокаут-мутация (КО) ЛДГ с потерей плазмиды

Фиг. 4


нЕИР
250000
200000
150000
100000
50000
0
0
1
2
3
4
5
6
7
мин
2.716 - Фосфорная кислота
4.213 - Молочная кислота
4.912 - Уксусная кислота
5.291
6.177 - 2-3-Бутандиол
6.896 - Этанол

Фиг. 5А


нЕИР
250000
200000
150000
100000
50000
0
0
1
2
3
4
5
6
7
8
min
2.731 - Молочная кислота
4.913 - Уксусная кислота
5.293
6.178 - 2-3-Бутандиол
6.900 - Этанол

Фиг. 5B