

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **035950**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.09.04

(21) Номер заявки
201791197

(22) Дата подачи заявки
2015.12.07

(51) Int. Cl. *C12N 15/74* (2006.01)
C12N 9/02 (2006.01)
C12N 9/10 (2006.01)
C12N 9/88 (2006.01)
C12P 1/04 (2006.01)
C12P 7/18 (2006.01)
C12R 1/145 (2006.01)

(54) РЕКОМБИНАНТНЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ, ПРОЯВЛЯЮЩИЕ ПОВЫШЕННЫЙ ПОТОК ПРИ ФЕРМЕНТАЦИОННОМ ПУТИ

(31) 62/089,053; 62/168,969

(32) 2014.12.08; 2015.06.01

(33) US

(43) 2017.11.30

(86) PCT/US2015/064351

(87) WO 2016/094334 2016.06.16

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ЛАНЦАТЕК НЬЮ ЗИЛЭНД
ЛИМИТЕД (NZ)**

(72) Изобретатель:
**Кёпке Михель, Мюллер Александер
Пол, Тран Лоан Пхуонг (US)**

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

(56) US-A1-20140256008

KOPKE, MICHAEL et al., '2,3-butanediol production by acetogenic bacteria, an alternative route to chemical synthesis, using industrial waste gas', Applied and Environmental Microbiology, 17 June 2011, Vol. 77, No. 15, pp. 5467-7475 See page 5470; abstract.

US-A1-20130210090

US-A1-20090203097

WO-A1-2014197746

(57) Изобретение относится к рекомбинантной, карбоксидотрофной бактерии Clostridium, которая экспрессирует одну или более пируват:ферредоксин-оксидоредуктазу (EC 1.2.7.1), ацетолактатсинтазу (EC 2.2.1.6) и ацетолактат декарбоксилазу (EC 4.1.1.5). В изобретении дополнительно предложен способ получения продукта ферментации путем ферментации рекомбинантной бактерии в присутствии газообразного субстрата, содержащего CO, для получения одного или более из этанола, бутанола, изопропанола, изобутанола, высших спиртов, бутандиола, 2,3-бутандиола, сукцината, изопреноидов, жирных кислот, биополимеров и их смесей.

B1**035950****035950****B1**

Настоящая заявка заявляет приоритет заявки на патент США 62/089053, поданной 8 декабря 2014 года, и заявки на патент США 62/168969, поданной 1 июня 2015 года, все содержание которых включено в данный документ посредством ссылки.

Уровень техники

Карбоксидотрофные микроорганизмы могут быть сконструированы для получения продуктов, таких как топливо и химические продукты, путем ферментации газообразного субстрата. Усилия по повышению концентрации продукта и использования субстрата исторически были сфокусированы на выборе штамма и оптимизации условий ферментации (Abubackar, Bioresour Technol, 114: 518-522, 2012). Однако метаболизм природных микроорганизмов не эволюционировал для достижения коммерческих целей с высокими выходами, скоростями и титрами, так что некоторые коммерческие цели не могут быть достигнуты путем простого отбора штаммов и оптимизации условий ферментации. Соответственно, остается потребность в улучшенных микроорганизмах и способах получения полезных продуктов, таких как топливо и химических продуктов.

Сущность изобретения

Изобретение обеспечивает рекомбинантную карбоксидотрофную бактерию *Clostridium*, содержащую один или более ферментов, выбранных из группы, состоящей из пируват:ферредоксин-оксидоредуктазы (EC 1.2.7.1), ацетолактатсинтазы (EC 2.2.1.6) и ацетолактат декарбоксилазы (EC 4.1.1.5), причем каждый фермент представляет собой сверхэкспрессированный эндогенный фермент, мутантный эндогенный фермент или экзогенный фермент. Рекомбинантная бактерия может экспрессировать один, два или все три из этих ферментов.

Рекомбинантная бактерия может быть получена из любого микроорганизма *Clostridium*. В одном варианте реализации изобретения рекомбинантная бактерия является полученной от *C. autoethanogenum*, *C. ljungdahlii* или *C. ragsdalei*. В предпочтительном варианте реализации изобретения, рекомбинантная бактерия получена из *C. autoethanogenum*, хранящейся под номером доступа DSMZ DSM23693 (*C. autoethanogenum* LZ1561).

Изобретение также относится к способу получения продукта ферментации, включающему ферментацию рекомбинантной бактерии в присутствии газообразного субстрата, содержащего CO, для получения одного или более из этанола, бутанола, изопропанола, изобутанола, высших спиртов, бутандиола, 2,3-бутандиола, сукцината, изопреноидов, жирных кислот, биополимеров и их смесей.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1 представляет собой карту потока пути биосинтеза этанола, в которой подробно измеряется активность фермента и поток через карбоксидотрофный микроорганизм для образования этанола через ацетил-КоА, что позволяет идентифицировать реакции, ограничивающие скорость реакции. Толщина стрелок пропорциональна активности конкретной реакции пути.

Фиг. 2 представляет собой карту пути, детализирующую измеренную активность фермента и поток через карбоксидотрофный микроорганизм для образования 2,3-бутандиола через пируват, что позволяет идентифицировать реакции с ограничением скорости.

Фиг. 3 представляет собой диаграмму, демонстрирующую путь 2,3-бутандиола и соответствующий путь биосинтеза аминокислот с разветвленной цепью. Пируват превращается в α -ацетолактат, промежуточное звено как для путей биосинтеза аминокислот 2,3-бутандиола, так и для биосинтеза аминокислот с разветвленной цепью. Эксперименты проводились для сверхэкспрессии PFOR, *alsS* и *alsD*.

Фиг. 4 представляет собой схематическое изображение плазмиды rMTL 83159. Плазмида содержит ген репликации (*ColE1*) граммотрицательного происхождения, ген репликации (*repH*) грамположительно-го происхождения, ген переноса *traJ*, ген *catP*, кодирующий устойчивость к хлорамфениколу/тиамфениколу, сайт множественного клонирования, расположенный в *lacZ* альфа кодирующей последовательности и промотора гена ферредоксина (P_{fdx}).

Фиг. 5 представляет собой набор графиков, демонстрирующих профили роста и метаболитов (биомасса, 2,3-бутандиол (BDO), уксусная кислота и этанол) в зависимости от времени пяти штаммов, выращенных в бутылках Schott.

Фиг. 6 представляет собой набор графиков, демонстрирующих профиль метаболита (верхние графики) и профиль газа (нижние графики) объединенного сверхэкспрессирующего штамма экспрессии PFOR, *alsS* и *alsD* и контрольный штамм плазмиды при поглощении CO 4 моль/л/день в течение 20 дней.

Фиг. 7 представляет собой набор графиков, демонстрирующих профили метаболита и газа сверхэкспрессирующей культуры при поглощении CO 8 моль/л/день в течение 11 дней.

Фиг. 8 представляет собой набор графиков, демонстрирующих биомассу и продуцирование бутандиолов культурами, экспрессирующими *A. hydrophila alsD* (открытые квадраты), *L. lactis alsD* (закрашенные квадраты) и контроль пустой плазмиды (треугольники). Значения представляют собой среднее значение трех повторений, а столбцы ошибок представляют одно стандартное отклонение.

Подробное описание изобретения

Ферментационный путь представляет собой каскад биохимических реакций (путей реакций), посредством которых субстрат, предпочтительно газообразный субстрат, превращается в продукт ферментации. Путь реакций обычно включает в себя ферменты, которые катализируют или увеличивают ско-

рость реакции пути.

"Поток" относится к потоку метаболитов через одну или более реакций в ферментационном пути. Поток через отдельные реакции путей имеет верхний и нижний пределы. Таким образом, поток может быть изменен путем регулирования условий или факторов, которые влияют на ферментативную активность. Регулирование потока через одну реакцию пути может изменить общий поток ферментационного пути. Поток может быть измерен в соответствии с любым способом, известным в данной области техники. В качестве примера, поток может быть измерен с использованием анализа баланса потока (FBA) (Gianchandani, *Systems Biol Medicine*, 2: 372-382, 2010). Поток через этот путь также может быть измерен с помощью уровня метаболитов и продуктов (метаболомика) (Patti, *Nat Rev Molec Cell Biol*, 13: 263-269, 2012) и/или экспериментов с такими метками, как C13 (флюксомика) (Niittylae, *Methods Mol Biol*, 553: 355-372, 2009; Tang, *Mass Spectrom Rev*, 28: 362-375, 2009).

Эффективность ферментационного пути может быть увеличена путем увеличения потока реакции через путь. Повышенный поток приводит к одному или более из: увеличения скорости роста микроорганизмов, выполняющих ферментацию, увеличения скорости роста и/или скорости образования продукта при повышенных концентрациях продукта, увеличения концентрации продукта ферментации в ферментационном бульоне, увеличения объема полученного продукта ферментации на каждый потребляемый объем субстрата, увеличения скорости производства или уровня производства продукта ферментации. Предпочтительно, повышенная эффективность приводит к увеличению скорости производства продукта ферментации.

Один из способов определения реакций ограничения скорости (узких мест) - это измерение активности ферментов для всех реакций, участвующих в пути ферментации от субстрата к продукту. Это можно сделать, анализируя ферментативную активность реакций в клетках, растущих в условиях процесса, чтобы идентифицировать реакции с самыми низкими скоростями. Затем они могут быть отрегулированы таким образом, чтобы не ограничивать скорость, тем самым увеличивая поток по всей системе. Ферментативная активность может быть измерена любым способом, известным в данной области техники, таким как способы, описанные в Huang, *J Bacteriol*, 194: 3689-3699, 2012.

Авторы изобретения проанализировали активность ферментов, участвующих в ферментационных путях, и обнаружили, что некоторые пути реакции проявляют существенно более низкую ферментативную активность, чем другие реакции на том же пути. Рекомбинантные микроорганизмы и способы, описанные в данном документе, особенно полезны для путей, где выход продукта в родительском микроорганизме может не иметь выхода продукта, чтобы быть жизнеспособной коммерческой мишенью.

Примеры путей ферментации, которые поддаются анализу активности ферментов, включают путь Вуд-Льюнгаля, пути ферментации для получения этанола, 2,3-бутандиола или его предшественника, такого как ацетил-КоА и пируват, и пути биосинтеза кофакторов тетрагидрофолата и кобаламина (B₁₂), которые могут потребоваться в ферментационных путях. Путь Вуд-Льюнгаля состоит из ряда реакций, катализируемых ферментами, как описано на фиг. 1 и фиг. 2. Шаги, следующие за путем Вуд-Льюнгаля, которые приводят к получению желаемых продуктов ферментации, также считаются частью пути ферментации.

В конкретном варианте реализации изобретения, путь ферментации приводит к получению продукта ферментации, выбранного из группы, состоящей из этанола, бутанола, изопропанола, изобутанола, высших спиртов, бутандиола, 2,3-бутандиола, сукцината, изопреноидов, жирных кислот, биополимеров, и их смеси.

Изобретение обеспечивает рекомбинантную карбоксидотрофную бактерию *Clostridium*, содержащую один или более ферментов, выбранных из группы, состоящей из пируват:ферредоксин-оксидоредуктазы (ЕС 1.2.7.1), ацетолактатсинтазы (ЕС 2.2.1.6) и ацетолактат декарбоксилазы (ЕС 4.1.1.5), причем каждый фермент представляет собой сверхэкспрессированный эндогенный фермент, мутантный эндогенный фермент или экзогенный фермент.

"Родительский микроорганизм" представляет собой микроорганизм, используемый для получения рекомбинантного микроорганизма по изобретению. Родительский микроорганизм может быть таким, который встречается в природе (т.е. микроорганизм дикого типа) или таким, который был ранее модифицирован (т.е. рекомбинантный микроорганизм). Рекомбинантные микроорганизмы по изобретению могут быть модифицированы для экспрессии или сверхэкспрессии одного или более ферментов, которые были или не были экспрессированы или сверхэкспрессированы в родительском микроорганизме, или могут быть модифицированы, чтобы продемонстрировать повышенную доступность одного или более кофакторов. В одном варианте реализации изобретения, родительский организм может быть *C. autoethanogenum*, *C. ljungdahlii* или *C. ragsdalei*. В особенно предпочтительном варианте реализации изобретения, родительский организм представляет собой *C. autoethanogenum* LZ1561, который храниться под номером доступа DSMZ DSM23693.

"Рекомбинантный микроорганизм" представляет собой микроорганизм, который подвергся генетической модификации по сравнению с родительским микроорганизмом. Генетическая модификация включает, например, вставку, делецию или замещение нуклеиновых кислот.

В целом, термин "полученный от" означает, что нуклеиновая кислота, белок или микроорганизм

модифицируют или адаптируют из другой (т. е. родительской или дикого типа) нуклеиновой кислоты, белка или микроорганизма, соответственно, с тем, чтобы создать новый рекомбинантный микроорганизм.

Способы генетической модификации родительского микроорганизма включают молекулярные методы, такие как экспрессия гетерологичных генов, вставка или делеция генома, измененная экспрессия генов или инактивация генов или способы ферментной инженерии. Такие методы 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; Park, *Protein Engineering and Design*, CRC Press, 2010. Экспрессирующие конструкторы/векторы могут содержать, например, один или более промоторов или сайтов связывания рибосом. Нуклеиновые кислоты и сконструированные/векторные последовательности, описанные в данном документе, могут также содержать стандартные линкерные нуклеотиды, такие как те, которые необходимы для сайтов связывания рибосом и/или сайтов рестрикции.

Нуклеиновые кислоты и конструкторы нуклеиновой кислоты, включающие экспрессионные конструкторы/векторы по изобретению, могут быть сконструированы с использованием любого способа, известного в данной области техники. Например, можно использовать химический синтез или рекомбинантные методы. Такие методы описаны, например, в Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989. По существу, отдельные гены и регуляторные элементы могут быть функционально связаны друг с другом, так что гены могут быть экспрессированы с образованием желаемых белков. Подходящие векторы будут оценены специалистами в данной области техники. Однако, в качестве примера, могут быть пригодны следующие векторы: векторы pMTL80000, pIMP1, pJIR750 и другие плазмиды.

Нуклеиновые кислоты могут быть доставлены в микроорганизм с использованием любого способа, известного в данной области техники. Например, нуклеиновые кислоты могут доставляться в микроорганизм в виде голых нуклеиновых кислот или могут быть объединены с одним или несколькими агентами (например, липосомами) для облегчения процесса трансформации в микроорганизм. Нуклеиновые кислоты могут быть ДНК, РНК, кДНК или их комбинацией, как это необходимо. Ингибиторы рестрикции могут использоваться в некоторых вариантах реализации изобретения (Murray, *Microbiol Molec Biol Rev*, 64: 412-434, 2000). Дополнительные векторы включают в себя плазмиды, вирусы (включая бактериофаг), космиды и искусственные хромосомы. В предпочтительном варианте реализации изобретения, нуклеиновые кислоты доставляют в микроорганизм с использованием плазмиды. Только в качестве примера, трансформация (включая трансдукцию или трансфекцию) может быть достигнута путем электропорации, ультразвуковой обработки, опосредованной полиэтиленгликолем трансформации, химической или природной компетентности, трансформации протопластов, индукции профага или конъюгации. Подходящие способы трансформации описаны, например, в Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

Сообщалось об использовании электропорации для ряда карбоксидотрофных ацетогенов, включая *C. ljungdahlii* (Koepeke, *PNAS*, 107: 13087-13092, 2010; WO/2012/053905), *C. autoethanogenum* (WO/2012/053905), *C. acetium* (Schiel-Bengelsdorf, *Synthetic Biol*, 15: 2191-2198, 2012) и *A. woodii* (Stratz, *Appl Environ Microbiol*, 60: 1033-1037, 1994). Сообщалось также об использовании электропорации у *Clostridia*, включая *C. acetobutylicum* (Mermelstein, *Biotechnol*, 10: 190-195, 1992) и *C. cellulolyticum* (Jennert, *Microbiol*, 146: 3071-3080, 2000). Кроме того, продемонстрирована индукция профага для карбоксидотрофных ацетогенов, включая *C. scatologenes* (Parthasarathy, *Development of a Genetic Modification System in Clostridium scatologenes ATCC 25775 for Generation of Mutants*, Masters Project, University of Western Kentucky, 2010), и описано конъюгирование для многих *Clostridia*, включая *C. difficile* (Herbert, *FEMS Microbiol Lett*, 229: 103-110, 2003) и *C. acetobutylicum* (Williams, *J Gen Microbiol*, 136: 819-826, 1990). Аналогичные способы могут быть использованы для карбоксидотрофных ацетогенов.

Изобретение обеспечивает рекомбинантную карбоксидотрофную бактерию *Clostridium*, адаптированную для проявления повышенного потока пути ферментации относительно родительского микроорганизма. В одном конкретном варианте реализации изобретения, родительский микроорганизм выбран из группы карбоксидотрофных *Clostridia*, включающей *C. autoethanogenum*, *C. ljungdahlii*, *C. ragsdalei*, *C. carboxidivorans*, *C. drakei*, *C. scatologenes*, *C. acetium*, *C. formicoaceticum* и *C. magnum*.

Рекомбинантная бактерия может быть получена из группы карбоксидотрофных *Clostridia*, содержащей виды *C. autoethanogenum*, *C. ljungdahlii*, *C. ragsdalei* и родственные изоляты. К ним относятся, но не ограничиваются ими, штаммы *C. autoethanogenum* JAI-1T (DSM10061) (Abrini, *Arch Microbiol*, 161: 345-351, 1994), *C. autoethanogenum* LBS1560 (DSM19630) (WO 2009/064200), *C. autoethanogenum* LZ1561 (DSM23693), *C. ljungdahlii* PETCT (DSM13528 = ATCC 55383) (Tanner, *Int J Syst Bacteriol*, 43: 232-236, 1993), *C. ljungdahlii* ERI-2 (ATCC 55380) (патент США 5593886), *C. ljungdahlii* C-01 (ATCC 55988) (патент США 6368819), *C. ljungdahlii* 0-52 (ATCC 55989) (патент США 6368819), *C. ragsdalei* P11T (ATCC BAA-622) (WO 2008/028055), родственные изоляты, такие как "*C. coskatii*" (публикация США 2011/0229947), или мутированные штаммы, такие как *C. ljungdahlii* OTA-1 (Tirado-Acevedo, *Production of Bioethanol from Synthesis Gas Using Clostridium ljungdahlii*, PhD thesis, North Carolina State University, 2010). Эти штаммы образуют субкластер в кластере I *Clostridial* pPHK, а их ген 16S pPHK более чем на 99% идентичен с та-

ким же низким содержанием GC около 30%. Однако эксперименты по реассоциации ДНК и ДНК и фингерпринтингу ДНК показали, что эти штаммы принадлежат к различным видам (WO 2008/028055). Штаммы этого кластера определяются общими характеристиками, имеют одинаковый генотип и фенотип, и все они имеют одинаковый режим сохранения энергии и ферментативного метаболизма. Штаммы этого кластера лишены цитохромов и сохраняют энергию через комплекс Rnf.

Все виды вышеуказанного кластера имеют сходную морфологию и размер (логарифмически растущие клетки между 0,5-0,7×3-5 мкм), мезофильные (оптимальная температура роста между 30 до 37°C) и строго анаэробные (Abrini, Arch Microbiol, 161: 345-351, 1994; Tanner, Int J Syst Bacteriol, 43: 232-236, 1993 и WO 2008/028055). Более того, все они разделяют одни и те же основные филогенетические черты, такие как, тот же диапазон pH (pH 4-7,5, с оптимальным начальным pH 5,5-6), интенсивный автотрофный рост на СО-содержащих газах с аналогичными скоростями роста, и аналогичный метаболический профиль с этанолом и уксусной кислотой в качестве основных конечных продуктов ферментации, и небольшие количества 2,3-бутандиола и молочной кислоты, образующихся при 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). Продукция индола наблюдалось у всех трех видов. Однако виды различаются в использовании субстратов различных сахаров (например, рамнозы, арабинозы), кислот (например, глюконата, цитрата), аминокислот (например, аргинина, гистидина) или других субстратов (например, бетаина, бутанола). Кроме того, некоторые из видов оказались ауксотрофными для некоторых витаминов (например, тиамина, биотина), в то время как другие не были. Было установлено, что организация и количество генов пути Вуд-Льюнгаля, ответственных за поглощение газа, одинаково у всех видов, несмотря на различия в нуклеиновых и аминокислотных последовательностях (Köpke, Curr Opin Biotechnol, 22: 320-325, 2011). Кроме того, восстановление карбоновых кислот в соответствующие спирты было показано у ряда этих микроорганизмов (Perez, Biotechnol Bioeng, 110: 1066-1077, 2012). Таким образом, эти признаки не специфичны для одного организма, такого как *C. autoethanogenum* или *C. ljungdahlii*, а скорее являются общими чертами для карбоксидотрофных, этанолсинтезирующих Clostridia, и можно ожидать, что механизмы работают аналогичным образом в отношении этих штаммов, хотя могут быть различия в продуктивности.

В одном варианте реализации изобретения, родительский микроорганизм представляет собой *C. autoethanogenum*, *C. ljungdahlii* или *C. ragsdalei*. Предпочтительно, родительским микроорганизмом является *C. autoethanogenum* дикого типа или *C. autoethanogenum*, который хранится под номером доступа DSMZ DSM10061 или DSM23693 (*C. autoethanogenum* LZ1561). В одном варианте реализации изобретения, рекомбинантная бактерия является полученной от *C. autoethanogenum*, *C. ljungdahlii* или *C. ragsdalei*. Предпочтительно, рекомбинантную бактерию получают из *C. autoethanogenum* дикого типа или *C. autoethanogenum*, которая хранится под номером доступа DSMZ DSM23693 (*C. autoethanogenum* LZ1561).

Ферменты и гены по изобретению могут быть сверхэкспрессированными эндогенными ферментами и генами, мутантными эндогенными ферментами и генами или экзогенными ферментами и генами.

Термин "эндогенный" относится к нуклеиновой кислоте или белку, который присутствует в дикой или родительской бактерии, из которой получена рекомбинантная бактерия по изобретению. В одном варианте реализации изобретения, экспрессия эндогенного гена может контролироваться экзогенным регуляторным элементом, таким как экзогенный промотор.

Термин "экзогенный" относится к нуклеиновой кислоте или белку, который не присутствует в бактерии дикого типа или родительской, из которой получена рекомбинантная бактерия по изобретению. В одном варианте реализации изобретения, экзогенный ген или фермент может быть получен из гетерологичного штамма или вида и введен в или экспрессирован в рекомбинантной бактерии. В другом варианте реализации изобретения, экзогенный ген или фермент может быть искусственно или рекомбинантно создан. Экзогенные нуклеиновые кислоты могут быть адаптированы для интегрирования в геном бактерии или для сохранения во внехромосомном состоянии в бактерии, например, в плазмиде.

"Ферментативная активность" в широком смысле относится к ферментативной активности, включая, но не ограничиваясь ими, активность фермента, количество фермента или доступность фермента, катализирующего реакцию. Соответственно, "увеличивающаяся" активность фермента включает в себя увеличение активности фермента, увеличение количества фермента или увеличение доступности фермента, катализирующего реакцию.

Гены и ферменты по изобретению могут быть разработаны или сконструированы с использованием любого способа, известного в данной области техники, включая, например, направленную эволюцию, основанную на знаниях конструкцию, способы случайного мутагенеза, перетасовку генов, оптимизацию кодонов, использование сайт-специфичных библиотек, и использование библиотек оценки сайта.

"Мутированный" относится к нуклеиновой кислоте или белку, которые были модифицированы в рекомбинантной бактерии по изобретению по сравнению с бактерией дикого типа или родительской бактерией, из которой получена рекомбинантная бактерия по изобретению. В одном варианте реализации изобретения, мутацией может быть делеция, инсерция или замена в гене, кодирующем фермент. В другом варианте реализации изобретения, мутацией может быть делеция, инсерция или замена одной или нескольких аминокислот в ферменте.

"Оптимизация кодона" относится к мутации нуклеиновой кислоты, такой как ген, для оптимизации или улучшения трансляции нуклеиновой кислоты в конкретном штамме или виде. Оптимизация кодона может привести к более быстрой трансляции или более высокой точности трансляции. В предпочтительном варианте реализации изобретения, гены, кодирующие ферменты по изобретению, представляют собой кодон, оптимизированный для экспрессии в *Clostridium*, в частности *C. autoethanogenum*, *C. ljungdahlii* и/или *C. ragsdalei*. В другом предпочтительном варианте реализации изобретения, гены, кодирующие ферменты по изобретению, представляют собой кодон, оптимизированный для экспрессии в *C. autoethanogenum* LZ1561.

"Сверхэкспрессированный" относится к любому усилению экспрессии нуклеиновой кислоты или белка в рекомбинантной бактерии по изобретению по сравнению с бактерией дикого типа или родительской бактерией, из которой получена рекомбинантная бактерия по изобретению. Повышенная экспрессия может быть достигнута любыми способами, известными в данной области техники, включая модификацию числа копий гена, скорости транскрипции гена, скорости трансляции гена или скорости деградации фермента.

"Сверхэкспрессированный эндогенный фермент" относится к эндогенному ферменту, который присутствует в более высоких уровнях в рекомбинантной бактерии по изобретению по сравнению с бактерией дикого типа или родительской бактерией, из которой получена рекомбинантная бактерия по изобретению. Сверхэкспрессированный эндогенный фермент также может кодироваться эндогенным геном, который может быть модифицирован, например, для контроля с помощью сильного или конститутивного промотора. Аналогично, "сверхэкспрессированный эндогенный ген" относится к эндогенному гену, который присутствует или транскрибирован с более высокими степенями или уровнями в рекомбинантной бактерии по изобретению по сравнению с бактерией дикого типа или родительской бактерией, из которой получена рекомбинантная бактерия по изобретению.

"Мутированный эндогенный фермент" относится к эндогенному ферменту, который мутирован или модифицирован в рекомбинантной бактерии по изобретению по сравнению с бактерией дикого типа или родительской бактерией, из которой получена рекомбинантная бактерия по изобретению. Аналогично, "мутированный эндогенный ген" относится к эндогенному гену, который мутирован или модифицирован в рекомбинантной бактерии по изобретению, по сравнению с бактерией дикого типа или родительской бактерией, из которой получена рекомбинантная бактерия по изобретению.

"Экзогенный фермент" относится к ферменту, который отсутствует в бактерии дикого типа или родительской бактерии, из которой получена рекомбинантная бактерия по изобретению. Аналогично, "экзогенный ген" относится к гену, который отсутствует в бактерии дикого типа или родительской бактерии, из которой получена рекомбинантная бактерия по изобретению. Как правило, экзогенный фермент или ген получают из гетерологичного штамма или вида и вводят в или экспрессируют в рекомбинантной бактерии.

Изобретение может быть осуществлено на практике с использованием вариантных нуклеиновых кислот или белков, последовательность которых отлична от последовательностей, специально проиллюстрированных в данном документе, при условии, что они выполняют по существу одну и ту же функцию. Для последовательностей нуклеиновых кислот, которые кодируют белок или пептид, это означает, что кодируемый белок или пептид имеет по существу одну и ту же функцию. Для последовательностей нуклеиновых кислот, которые представляют собой промоторные последовательности, вариантная последовательность будет обладать сходной способностью промотировать экспрессию одного или более генов. Такие нуклеиновые кислоты или белки могут упоминаться в данном документе как "функционально эквивалентные варианты". В качестве примера, функционально эквивалентные варианты нуклеиновой кислоты включают аллельные варианты, фрагменты гена, гены, которые содержат мутации (делецию, инсерцию, нуклеотидные замены и т.п.) и/или полиморфизмы и т.п. Гомологичные гены из других микроорганизмов также можно рассматривать как примеры функционально эквивалентных вариантов последовательностей, специально иллюстрируемых в данном документе. К ним относятся гомологичные гены у таких видов, как *C. acetobutylicum*, *C. beijerinckii* или *C. ljungdahlii*, подробности которых доступны на веб-сайтах, таких как Genbank или NCBI. Функционально эквивалентные варианты включают также нуклеиновые кислоты, последовательность которых изменяется в результате оптимизации кодонов для конкретного организма. Функционально эквивалентный вариант нуклеиновой кислоты будет предпочтительно иметь по меньшей мере приблизительно 70 %, приблизительно 80 %, приблизительно 85 %, приблизительно 90 %, приблизительно 95 %, приблизительно 98 % или более идентичности последовательности нуклеиновой кислоты с указанной нуклеиновой кислотой. Функционально эквивалентный вариант белка предпочтительно будет иметь по меньшей мере приблизительно 70 %, приблизительно 80 %, приблизительно 85 %, приблизительно 90 %, приблизительно 95 %, приблизительно 98 % или более аминокислотной идентичности с указанным белком. Такие варианты включают фрагмент белка или пептида, причем фрагмент содержит усеченную форму белка или пептида, где делеции могут быть от 1 до 5, от 10 до 15, от 20 до 25 аминокислот и могут длиться от остатка 1 до 25 на любом конце полипептида и причем делеции могут быть любой длины в пределах участка или могут быть во внутреннем местоположении. Функциональная эквивалентность варианта нуклеиновой кислоты или белка может быть оценена с ис-

пользованием любого метода, известного в данной области техники. Однако, в качестве примера, анализы для проверки активности некоторых ферментов описаны в Huang, J Bacteriol, 194: 3689-3699, 2012.

В некоторых вариантах реализации изобретения, имеющих активные системы рестрикционных ферментов, может оказаться необходимым метилировать нуклеиновую кислоту перед введением нуклеиновой кислоты в микроорганизм.

Как правило, метилирование осуществляют с использованием члнчного микроорганизма, предпочтительно с рестрикционным отрицательным члнчным микроорганизмом, таким как *E.coli*, *B. subtilis* или *L. lactis*, что облегчает метилирование последовательностей нуклеиновых кислот, которые составляют экспрессионный конструкт/вектор. Метилирующий конструкт/вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую метилтрансферазу. После того как экспрессионный конструкт/вектор и метилирующий конструкт/вектор вводят в члнчный микроорганизм, индуцируется ген метилтрансферазы, присутствующий в метилирующем конструкте/векторе. Индукция может происходить с помощью любой подходящей промоторной системой, хотя в одном конкретном варианте реализации изобретения метилирующий конструкт/вектор содержит индуцибельный *lac*-промотор и индуцируется добавлением лактозы или ее аналога, более предпочтительно изопропил- β -D-тиогалактозида (ИПТГ). Другие подходящие промоторы включают систему *ara*, *tet* или T7. В другом варианте реализации изобретения, метилирующий конструкт/вектор промотор является конститутивным промотором.

В конкретном варианте реализации изобретения, метилирующий конструкт/вектор имеет начало репликации, характерное для идентификации члнчного микроорганизма, так что любые гены, присутствующие в метилирующем конструкте/векторе, экспрессируются в члнчном микроорганизме. Предпочтительно, экспрессирующий конструкт/вектор имеет начало репликации, специфичное для идентификации целевого микроорганизма, так что любые гены, присутствующие в экспрессирующем конструкте/векторе, экспрессируются в целевом микроорганизме.

Экспрессия фермента метилтрансферазы приводит к метилированию генов, присутствующих в экспрессирующем конструкте/векторе. Экспрессирующий конструкт/вектор затем можно выделить из члнчного микроорганизма в соответствии с любым способом, известным в данной области техники. В одном варианте реализации изобретения, оба конструкта/вектора одновременно изолированы. Экспрессирующий конструкт/вектор можно вводить в целевой микроорганизм с использованием любого способа, известного в данной области техники. Поскольку экспрессирующий конструкт/вектор метилирован, последовательности нуклеиновых кислот, присутствующие в экспрессирующем конструкте/векторе, могут быть включены в целевой микроорганизм и успешно экспрессированы.

Ген метилтрансферазы может быть введен в члнчный микроорганизм и сверхэкспрессирован. Таким образом, в одном варианте реализации изобретения, полученный фермент метилтрансферазы может быть собран с использованием известных способов и использован *in vitro* для метилирования экспрессионной плазмиды. Затем экспрессирующий конструкт/вектор можно ввести в целевой микроорганизм для экспрессии. В другом варианте реализации изобретения, ген метилтрансферазы вводится в геном члнчного микроорганизма с последующим введением экспрессирующего конструкта/вектора в члнчный микроорганизм, выделением одного или более конструктов/векторов из члнчного микроорганизма и последующим введением экспрессирующего конструкта/вектора в целевой микроорганизм.

Экспрессионный конструкт/вектор и метилирующий конструкт/вектор могут быть объединены для обеспечения композиции. Такая композиция особенно полезна при обходе механизмов рестрикционного барьера для получения рекомбинантных микроорганизмов по изобретению. В одном конкретном варианте реализации изобретения, экспрессионный конструкт/вектор и/или метилирующий конструкт/вектор представляют собой плазмиды. Может быть использован ряд подходящих метилтрансфераз, включая, например, фаг *B. subtilis* ФТ1-метилтрансферазы или метилтрансферазы, описанный в WO 2012/053905. Аналогично, для создания метилирующего конструкта/вектора можно использовать ряд конструктов/векторов, адаптированных для обеспечения экспрессии гена метилтрансферазы.

В качестве примера, в одном варианте реализации изобретения, рекомбинантный микроорганизм по изобретению может быть получен способом, включающим (а) введение в члнчный микроорганизм (i) экспрессирующего конструкта/вектора, содержащего нуклеиновую кислоту, как описано в данном документе и (ii) метилирующего конструкта/вектора, содержащего ген метилтрансферазы; и (b) экспрессию гена метилтрансферазы; выделение одного или более конструктов/векторов из члнчного микроорганизма; и введение одного или более конструкта/вектора в целевой микроорганизм. В одном варианте реализации изобретения, ген метилтрансферазы стадии (b) экспрессируется конститутивно. В другом варианте реализации изобретения, индуцируется экспрессия гена метилтрансферазы стадии (b).

Рекомбинантная бактерия по изобретению содержит одну или более пируват:ферредоксин-оксидоредуктазу, ацетолактатсинтазу и ацетолактат декарбоксилазу.

Пируват:ферредоксин-оксидоредуктаза (PFOR или POR) (EC 1.2.7.1) представляет собой фермент, принадлежащий к семейству оксидоредуктаз, который катализирует перенос электронов с одной молекулы (восстановитель или донор электронов) на другую (окислитель или акцептор электронов). В частности, пируват:ферредоксин-оксидоредуктаза катализирует взаимопревращение пирувата и ацетил-КоА: пирувата + КоА + 2 окисленных ферредоксин-ацетил-КоА + CO₂ + 2 восстановленных ферредоксина +

$2H^+$. Превращение ацетил-КоА в пируват связывает путь Вуд-Льюнга для автотрофной фиксации CO_2 с циклом восстановления трикарбоновых кислот, который в автотрофных анаэробах является стадией биосинтеза всех клеточных макромолекул (Furdi, J Biol Chem, 15: 28494-28499, 2000). Пируват:ферредоксин-оксидоредуктаза также может быть известна как пируват: ферредоксин-2-оксидоредуктаза (КоА-ацетилизация), пируват-оксидоредуктаза, пируват-синтаза, пируватсинтаза или пирувино-ферредоксин-оксидоредуктаза.

Фермент пируват:ферредоксин-оксидоредуктаза по изобретению может представлять собой сверхэкспрессированный эндогенный фермент, мутантный эндогенный фермент или экзогенный фермент. Аналогично, фермент пируват:ферредоксин-оксидоредуктаза по изобретению может быть кодирован с помощью гена эндогенной пируват:ферредоксин-оксидоредуктазы, который был сконструирован для сверхэкспрессии, может быть кодирован мутированным геном эндогенной пируват:ферредоксин-оксидоредуктазы или может быть кодирован геном экзогенной пируват:ферредоксин-оксидоредуктазы. В предпочтительном варианте реализации изобретения, фермент пируват:ферредоксин-оксидоредуктаза является сверхэкспрессированной эндогенной пируват:ферредоксин-оксидоредуктазой, такой как сверхэкспрессированная эндогенная пируват:ферредоксин-оксидоредуктаза *C. autoethanogenum*, *C. ljungdahlii* или *C. ragsdalei*. Ферменты пируват:ферредоксин-оксидоредуктазы часто нестабильны в присутствии кислорода. В предпочтительном варианте реализации изобретения, фермент пируват:ферредоксин-оксидоредуктаза является кислородостойким или демонстрирует по меньшей мере некоторую степень кислородной нечувствительности. В другом предпочтительном варианте реализации изобретения, фермент пируват:ферредоксин-оксидоредуктаза представляет собой экзогенную пируват:ферредоксин-оксидоредуктазу *Desulfovibrio africanus* или фермент, полученный из нее. Экспрессия пируват:ферредоксин-оксидоредуктазы *D. africanus* была продемонстрирована у *E. coli* (Pieulle, J Bacteriol, 179: 5684-5692, 1997), но не в микроорганизме *Clostridium*.

Ацетолактатсинтаза (Als) (EC 2.2.1.6) представляет собой фермент, который катализирует первую стадию синтеза аминокислот с разветвленной цепью, таких как валин, лейцин и изолейцин. В частности, ацетолактатсинтаза представляет собой транскетолазу, которая имеет как катаболические, так и анаболические формы, и катализирует превращение двух молекул пирувата в молекулу ацетолактата и диоксид углерода: $2 CH_3COCOO^- \leftrightarrow CH_3COC(=O)CH_2COO^- + CO_2$. Ацетолактатсинтазу также можно назвать синтазой ацетогидроксикислоты.

Фермент ацетолактатсинтаза по изобретению может представлять собой сверхэкспрессированный эндогенный фермент, мутантный эндогенный фермент или экзогенный фермент. Аналогично, фермент ацетолактатсинтаза по изобретению может быть кодирован геном эндогенной ацетолактатсинтазы, который был сконструирован для сверхэкспрессии, может быть кодирован мутированным эндогенным геном ацетолактатсинтазы или может быть кодирован геном экзогенной ацетолактатсинтазы. Ацетолактатсинтаза может быть анаболической или катаболической. В предпочтительном варианте реализации изобретения, фермент ацетолактатсинтаза является сверхэкспрессируемой эндогенной ацетолактатсинтазой, такой как сверхэкспрессированная эндогенная ацетолактатсинтаза *C. autoethanogenum*, *C. ljungdahlii* или *C. ragsdalei*. В частности, фермент ацетолактатсинтаза может быть сверхэкспрессированной эндогенной ацетолактатсинтазой, такой как мутированная ацетолактатсинтаза, полученная из любой эндогенной ацетолактатсинтазы *C. autoethanogenum*, *C. ljungdahlii* или *C. ragsdalei*. В частности, мутированная эндогенная ацетолактатсинтаза может быть нечувствительной к обратной связи *IlvN* ацетиллактат-синтазой. В предпочтительном варианте реализации изобретения, фермент ацетолактатсинтаза представляет собой экзогенную ацетолактатсинтазу, такую как ацетолактатсинтазу *Bacillus subtilis*, в частности, нечувствительную к обратной связи *Bsillilis AlsS* ацетолактат-синтазу. Экспрессирование *B. subtilis AlsS* было показано в *Synechococcus elongatus* sp. штамм PCC 7942 (Oliver, Metabol Eng, 22: 76-82, 2014), но не в микроорганизме *Clostridium*.

Ацетолактат декарбоксилаза (EC 4.1.1.5) представляет собой фермент, принадлежащий к семейству лиаз, в частности карбоксилаз, которые расщепляют углерод-углеродные связи. Ацетолактат декарбоксилаза катализирует реакцию (S)-2-гидрокси-2-метил-3-оксобутаноата на (R) -2-ацетоин и CO_2 : (S)-2-гидрокси-2-метил-3-оксобутаноат (R)-2-ацетоин + CO_2 . Ацетолактат декарбоксилаза также может быть известна, как альфа-ацетолактатдекарбоксилаза или (S)-2-гидрокси-2-метил-3-оксобутаноат карбоксилиаза.

Фермент ацетолактат декарбоксилаза по изобретению может представлять собой сверхэкспрессированный эндогенный фермент, мутантный эндогенный фермент или экзогенный фермент. Аналогично, фермент ацетолактат декарбоксилаза по изобретению может быть кодирован эндогенным геном ацетолактат декарбоксилазы, который был сконструирован для сверхэкспрессии, может быть кодирован мутированным геном эндогенной ацетолактат декарбоксилазы или может быть кодирован геном экзогенной ацетолактат декарбоксилазы. В предпочтительном варианте реализации изобретения, фермент ацетолактат декарбоксилаза является сверхэкспрессированной эндогенной ацетолактат декарбоксилазой, такой как сверхэкспрессированная эндогенная ацетолактат декарбоксилаза *C. autoethanogenum*, *C. ljungdahlii*

или *C. ragsdalei*. Сверхэкспрессированная эндогенная ацетолактат декарбоксилаза может представлять собой BudA ацетолактат декарбоксилазу или AlsD ацетолактат декарбоксилазу. В предпочтительном варианте реализации изобретения, фермент ацетолактат декарбоксилаза представляет собой экзогенную ацетолактат декарбоксилазу, такую как ацетолактат декарбоксилаза *Aeromonas hydrophila* или ацетолактат декарбоксилаза *Leuconostoc lactis*. Экспрессирование *B. subtilis* AlsD было показано в *Synechococcus elongatus* sp. штамм PCC 7942 (Oliver, Metabol Eng, 22: 76-82, 2014), но не в микроорганизме *Clostridium*.

Ферменты пируват:ферредоксин-оксидоредуктаза, ацетолактатсинтаза и ацетолактат дегидрогеназа могут содержать или могут быть получены из любой аминокислотной последовательности в следующей таблице. Аналогично, гены, кодирующие ферменты пируват:ферредоксин-оксидоредуктазу, ацетолактатсинтазу и ацетолактат дегидрогеназу, могут содержать или могут быть получены из любой последовательности нуклеиновых кислот в следующей таблице. Более того, любой из ферментов или генов может быть вариантами последовательностей в следующей таблице. Например, ферменты или гены могут иметь около 80%, около 90%, около 95% или около 99% идентичности последовательности с последовательностями в следующей таблице.

SEQ ID NO:	Описание
1	нативная пируват:ферредоксин-оксидоредуктаза, <i>C. autoethanogenum</i> LZ1561, последовательность нуклеиновой кислоты
2	нативная пируват:ферредоксин-оксидоредуктаза, <i>C. autoethanogenum</i> LZ1561, аминокислотная последовательность
3	оптимизированная по кодону пируват:ферредоксин-оксидоредуктаза с XbaI и NheI, <i>C. autoethanogenum</i> LZ1561, последовательность нуклеиновой кислоты
4	оптимизированная по кодону пируват:ферредоксин-оксидоредуктаза, <i>C. autoethanogenum</i> LZ1561, аминокислотная последовательность
5	пируват:ферредоксин-оксидоредуктаза с XbaI и NheI, <i>D. africanus</i> , последовательность нуклеиновой кислоты
6	пируват:ферредоксин-оксидоредуктаза, <i>D. africanus</i> , аминокислотная последовательность
7	нативная IlvB ORF2059 ацетолактатсинтаза, <i>C. autoethanogenum</i> LZ1561, последовательность нуклеиновой кислоты
8	нативная IlvB ORF2059 ацетолактатсинтаза, <i>C. autoethanogenum</i> LZ1561, аминокислотная последовательность
9	нативная IlvB ORF2336 ацетолактатсинтаза, <i>C. autoethanogenum</i> LZ1561, последовательность нуклеиновой кислоты
10	нативная IlvB ORF2336 ацетолактатсинтаза, <i>C. autoethanogenum</i> LZ1561, аминокислотная последовательность
11	нативная IlvN ацетолактатсинтаза (регуляторная субъединица) с NdeI и SacI, <i>C. autoethanogenum</i> LZ1561, последовательность нуклеиновой кислоты
12	нативная IlvN ацетолактатсинтаза (регуляторная субъединица), <i>C. autoethanogenum</i> LZ1561, аминокислотная последовательность
13	мутантная IlvN (G-10-D) ацетолактатсинтаза (регуляторная субъединица) с NdeI и SacI, <i>C. autoethanogenum</i> LZ1561, последовательность нуклеиновой кислоты
14	мутантная IlvN (G-10-D) ацетолактатсинтаза (регуляторная субъединица), <i>C. autoethanogenum</i> LZ1561, аминокислотная последовательность
15	нативная AlsS-ацетолактатсинтаза, <i>C. autoethanogenum</i> LZ1561, последовательность нуклеиновой кислоты
16	нативная AlsS-ацетолактатсинтаза, <i>C. autoethanogenum</i> LZ1561, аминокислотная последовательность

17	оптимизированная по кодону AlsS-ацетолактатсинтаза с NdeI и SacI, <i>C. autoethanogenum</i> LZ1561, последовательность нуклеиновой кислоты
18	оптимизированная по кодону AlsS ацетолактатсинтаза, <i>C. autoethanogenum</i> LZ1561, аминокислотная последовательность
19	ацетолактатсинтаза с NdeI и SacI, <i>B. subtilis</i> , последовательность нуклеиновой кислоты
20	ацетолактатсинтаза, <i>B. subtilis</i> , аминокислотная последовательность
21	нативная ацетолактат декарбоксилаза, <i>C. autoethanogenum</i> LZ1561, последовательность нуклеиновой кислоты
22	нативная ацетолактат декарбоксилаза, <i>C. autoethanogenum</i> LZ1561, аминокислотная последовательность
23	оптимизированная по кодону ацетолактат декарбоксилаза с SacI и KpnI, <i>C. autoethanogenum</i> LZ1561, последовательность нуклеиновой кислоты
24	оптимизированная по кодону ацетолактат декарбоксилаза, <i>C. autoethanogenum</i> LZ1561, аминокислотная последовательность
25	ацетолактат декарбоксилаза, <i>A. hydrophila</i> , последовательность нуклеиновой кислоты
26	ацетолактат декарбоксилаза, <i>A. hydrophila</i> , аминокислотная последовательность
27	ацетолактат декарбоксилаза с SacI и KpnI, <i>L. lactis</i> , последовательность нуклеиновой кислоты
28	ацетолактат декарбоксилаза, <i>L. lactis</i> , аминокислотная последовательность

Рекомбинантная бактерия по изобретению может также содержать любую комбинацию пируват: ферредоксин-оксидоредуктазы, ацетолактатсинтазы и ацетолактат декарбоксилазы. Бактерия может содержать пируват:ферредоксин-оксидоредуктазу и ацетолактатсинтазу, но не ацетолактат декарбоксилазу. Бактерия может содержать пируват:ферредоксин-оксидоредуктазу и ацетолактат декарбоксилазу, но не ацетолактатсинтазу. Бактерия может содержать ацетолактатсинтазу и ацетолактат декарбоксилазу, но не пируват:ферредоксин-оксидоредуктазу. Наконец, бактерия может содержать каждую из пируват: ферредоксин-оксидоредуктазы, ацетолактатсинтазы и ацетолактат декарбоксилазы.

Рекомбинантная бактерия по изобретению может дополнительно экспрессировать или быть сконструирована для экспрессии или сверхэкспрессии одной или более алкогольдегидрогеназы (ЕС 1.1.1.1), альдегиддегидрогеназы (ацилирование) (ЕС 1.2.1.10), формилатдегидрогеназы (ЕС 1.2.1.2), формил-ТГФ-синтазы (ЕС 6.3.2.17), метилен-ТГФ-дегидрогеназа/формил-ТГФ-циклолидролы (ЕС: 6.3.4.3), метилен-ТГФ-редуктазы (ЕС 1.1, 1.58), СО дегидрогеназы/ацетил-КоА-синтазы (ЕС 2.3.1.169), альдегид ферредоксин-оксидоредуктазы (ЕС 1.2.7.5), фосфотрансацетилазы (ЕС 2.3.1.8), ацетат киназы (ЕС 2.7.2.1), дегидрогеназы СО (ЕС 1.2.99.2), гидрогеназы (ЕС 1.12.7.2), пируват:формиат лиазы (ЕС 2.3.1.54), 2,3-бутандиолдегидрогеназы (ЕС 1.1.1.4), первичной:вторичной алкогольдегидрогеназы (ЕС 1.1.1.1), формиатдегидрогеназы (ЕС 1.2.1.2), формил-ТГФ синтазы (ЕС 6.3.2.17), метилен-ТГФ-дегидрогеназы/формил-ТГФ-циклолидролы (ЕС:6.3.4.3), метилен-ТГФ-редуктазы (ЕС 1.1,1.58), СО дегидрогеназы/ацетил-КоА-синтазы (ЕС 2.3.1.169), СО дегидрогеназы (ЕС 1.2.99.2) и гидрогеназы (ЕС 1.12.7.2).

"Кофактор фермента" или просто "кофактор" представляет собой небелковое соединение, которое связывается с ферментом для облегчения биологической функции фермента и, таким образом, для катализа реакции. Неограничивающие примеры кофакторов включают НАД⁺, НАДФ⁺, кобаламин, тетрагидрофолат и ферредоксин. "Никотинамидадениндинуклеотид" (НАДН) относится к НАД⁺ (окисленная форма), НАДН⁺Н⁺ (восстановленная форма) или к окислительно-восстановительной паре НАД⁺ и НАДН⁺Н⁺. "Никотинамидадениндинуклеотидфосфат" (НАДФН) относится либо к НАДФ⁺ (окисленная форма), НАДФН⁺Н⁺ (восстановленная форма), либо к окислительно-восстановительной паре НАДФ⁺ и НАДФН⁺Н⁺. Увеличение общей доступности кофактора может увеличить скорость реакции пути. Факторы, которые могут влиять на продукцию кофактора, включают экспрессию генов биосинтеза кофактора,

которые могут быть изменены для достижения повышенной доступности кофактора. Другие факторы, известные специалисту в данной области техники, могут также использоваться для достижения повышенной доступности кофактора. Отсутствие кофакторов может иметь ограничивающие скорость эффекты на пути реакции. Способы определения доступности кофакторов известны в данной области техники.

Рекомбинантная бактерия по изобретению может дополнительно экспрессировать или быть сконструирована для экспрессии или сверхэкспрессии фермента, участвующего в биосинтезе кофактора. В конкретном варианте реализации изобретения, кофактор включает тетрагидрофолат. Ферменты, участвующие в биосинтезе тетрагидрофолата, подробно описаны ниже. Соответственно, в конкретном варианте реализации изобретения, рекомбинантный микроорганизм проявляет повышенную экспрессию ГТФ-циклогидролазы I (ЕС 3.5.4.16), щелочной фосфатазы (ЕС 3.1.3.1), дигидронеоптерин-альдолазы (ЕС 4.1.2.25), 2-амино-4-6-гидроксиметилдигидроптеридиндифосфокиназы (ЕС 2.7.6.3), дигидроптеродатсинтазы (2.5.1.15), дигидроптероатсинтазы (ЕС 2.5.1.15), дигидрофолатсинтазы (ЕС 6.3.2.12), фолилполиглутаматсинтазы (6.3.2.17), дигидрофолатредуктазы (ЕС 1.5.1.3), тимидилатсинтазы (ЕС 2.1.1.45), дигидромонаптеринредуктазы (ЕС 1.5.1.-). В конкретном варианте реализации изобретения, кофактор содержит кобаламин (B_{12}). Ферменты, участвующие в биосинтезе кобаламина, подробно описаны ниже. Соответственно, в конкретном варианте реализации изобретения, рекомбинантный микроорганизм проявляет повышенную экспрессию 5-аминолевулинатсинтазы (ЕС 2.3.1.37), 5-аминолевулинат:пируват аминотрансферазы (ЕС 2.6.1.43), аденозилкобинамидкиназы/аденозилкобинамид-фосфатгуанилилтрансферазы (ЕС 2.7.1.156/2.7.7.62), аденозилкобинамид-ГДФ рибазолтрансферазы (ЕС 2.7.8.26), аденозилкобинамид-фосфатсинтазы (ЕС 6.3.1.10), синтазы аденозилкомовой кислоты (ЕС 6.3.5.10), альфа-рибазолфосфатазы (ЕС 3.1.3.73), *cob(I)*аланин-аденозилтрансферазы (ЕС 2.5.1.17), *cob(II)*уриновой кислоты α,ϵ -диамидредуктазы (ЕС 1.16.8.1), гидролазы кобальта-прекоррина 5A (ЕС 3.7.1.12), кобальт-прекоррин-5B (C1) -метилтрансферазы (ЕС 2.1.1.195), кобальт-прекоррин-7 (C15) -метилтрансферазы (ЕС 2.1.1.196), кобальтохелатазы *CobN* (ЕС 6.6.1.2), кобириновой кислоты α,ϵ -диамидсинтазы (ЕС 6.3.5.9/6.3.5.11), ферритина (ЕС 1.16.3.1), глутамат-1-полуальдегида 2,1-аминомутаза (ЕС 5.4.3.8), глутамил-тРНК-редуктазы (ЕС 1.2.1.70), глутамил-тРНК синтазы (ЕС 6.1.1.17), гидроксиметилбиалансинтазы (ЕС 2.5.1.61), никотинат-нуклеотид-диметилбензимидазол фосфорибозилтрансферазы (ЕС 2.4.2.21), кислородзависимой копропорфириноген-III оксидазы (ЕС 1.3.99.22), порфобилиногенсинтазы (ЕС 4.2.1.24), прекокоррин-2 дегидрогеназы/сирогидрохлорин феррохелатазы (ЕС 1.3.1.76/4.99.1.4), прекокоррин-2/кобальт-фактор-2 C20-метилтрансферазы (ЕС 2.1.1.130/2.1.1.151), прекокоррин-3B синтазы (ЕС 1.14.13.83), прекокоррин-3B C17-метилтрансферазы (ЕС 2.1.1.131), прекокоррин-4 C11-метилтрансферазы (ЕС 2.1.1.133), прекокоррин-6X редуктазы (ЕС 1.3.1.54), прекокоррин-6Y C5,15-метилтрансферазы (ЕС 2.1.1.132), прекокоррин-8W декарбоксилазы (ЕС 1.-.-.-), прекокоррин-8X метилмутаза (ЕС 5.4.1.2), сирогидрохлорин кобальтохелатазы (ЕС 4.99.1.3), треонин-фосфат декарбоксилаза (ЕС 4.1.1.81), уропорфириноген декарбоксилазы (ЕС 4.1.1.37), уропорфириноген III метилтрансфераза/синтазы (ЕС 2.1.1.107/4.2.1.75). Не желая связывать себя теорией, полагают, что увеличение доступности кофактора достигается за счет избыточной экспрессии ферментов или генов, участвующих в пути биосинтеза указанного кофактора. В результате, реакции, зависящие от этого кофактора, уже не ограничиваются.

Изобретение также относится к способам получения одного или более продуктов путем ферментации субстрата, содержащего СО. Предпочтительно, продукт представляет собой один или более из этанола, бутанола, изопропанола, изобутанола, высших спиртов, бутандиола, 2,3-бутандиола, сукцината, изопреноидов, жирных кислот, биополимеров и их смесей.

В одном варианте реализации изобретения, субстрат, содержащий СО, представляет собой газообразный субстрат, содержащий СО. В одном варианте реализации изобретения, субстрат обычно содержит основную часть СО, такую как от около 20 до около 100% СО по объему, от 20 до 70% СО по объему, от 30 до 60% СО по объему или из 40-55% СО по объему. В конкретных вариантах реализации изобретения, подложка содержит около 25%, около 30%, около 35%, около 40%, около 45%, около 50% СО, около 55% СО или около 60% СО по объему.

Хотя нет необходимости для субстрата содержать какой-либо водород, присутствие водорода не должно быть вредным для образования продукта в соответствии со способами по изобретению. В конкретных вариантах реализации изобретения, присутствие водорода приводит к повышению общей эффективности производства спирта. Например, в конкретных вариантах реализации изобретения, субстрат может содержать прим. 2:1 или 1:1 или 1:2 соотношения $H_2:CO$. В одном варианте реализации изобретения, субстрат содержит около 30% или менее H_2 по объему, 20% или менее H_2 по объему, около 15% или менее H_2 по объему или около 10% или менее H_2 по объему. В других вариантах реализации изобретения, поток субстрата содержит низкие концентрации H_2 , например, менее чем 5%, менее чем 4%, менее чем 3%, менее чем 2% или менее чем 1% H_2 . В других вариантах реализации изобретения, поток субстрата по существу не содержит водорода. Субстрат может также содержать некоторое количество CO_2 , например, от около 1 до 80% CO_2 по объему или от около 1% до около 30% CO_2 по объему. В одном варианте реализации изобретения, субстрат содержит менее чем или равен около 20% CO_2 по объему. В конкретных вариантах реализации изобретения, субстрат содержит менее чем или равен около 15% CO_2 по объему, менее чем или равен около 10% CO_2 по объему, менее чем или равен около 5% CO_2 по объему.

или, по существу, не содержит CO_2 .

Варианты реализации изобретения описаны в терминах доставки и ферментации "газообразного субстрата, содержащего CO ". Однако следует понимать, что газообразный субстрат может быть представлен в альтернативных формах. Например, газообразный субстрат, содержащий CO , можно предоставить растворенным в жидкости. По существу, жидкость насыщена газом, содержащим монооксид углерода, и затем эту жидкость добавляют в биореактор. Это может быть достигнуто с использованием стандартной методологии. В качестве примера, можно использовать генератор микропузырьковой дисперсии (Hensirisak, Appl Biochem Biotechnol, 101: 211-227, 2002). В качестве дополнительного примера, газообразный субстрат, содержащий CO , может адсорбироваться на твердом носителе. Такие альтернативные способы охватываются термином "субстрат, содержащий CO " и тому подобное.

Газообразный субстрат может быть CO -содержащим отходящим газом, полученным в качестве побочного продукта промышленного процесса или из какого-либо другого источника, такого как автомобильные выхлопные газы или газификация биомассы. В некоторых вариантах реализации изобретения, промышленный процесс выбирают из группы, состоящей из производства изделий из черных металлов, таких как сталелитейное производство, производство цветных изделий, процессы переработки нефти, газификация угля, производство электроэнергии, производство чистого углерода, производство аммиака, производство метанола и производство кокса. В этих вариантах реализации изобретения, CO -содержащий газ может быть захвачен из промышленного процесса до его выброса в атмосферу любым удобным способом. CO может быть компонентом сингаза (газ, содержащий монооксид углерода и водород). CO , получаемый из промышленных процессов, обычно сжигается для производства CO_2 , и поэтому изобретение имеет особую полезность для снижения выбросов парниковых газов CO_2 и в производстве биотоплива. В зависимости от состава газообразного CO -субстрата может быть также желательно обработать его для удаления любых нежелательных примесей, таких как частицы пыли, перед их введением в ферментацию. Например, газообразный субстрат может быть отфильтрован или промыт с использованием известных способов.

Как правило, ферментацию проводят в биореакторе. Термин "биореактор" включает в себя ферментационное устройство, состоящее из одного или более сосудов и/или вышек или трубопроводов, таких как непрерывный реактор с мешалкой (CSTR), реактор с иммобилизованными клетками (ICR), реактор с орошаемым слоем (TBR), барботажная колонна, газлифтный ферментер, статический смеситель или другой сосуд или другое устройство, подходящее для газожидкостного контакта. В некоторых вариантах реализации изобретения, биореактор может содержать первый реактор роста и второй ферментационный реактор. Как таковое, когда речь идет о добавлении субстрата в биореактор или реакции ферментации, следует понимать, что оно включает добавление к любому из этих реакторов или к обоим из них, если это необходимо. Используемые в данном документе, термины "ферментация", "процесс ферментации", "реакция ферментации" и тому подобное охватывают фазу роста и биосинтеза продукта процесса ферментации.

В некоторых вариантах реализации изобретения, культура бактерии по изобретению поддерживается в водной культуральной среде, которая содержит питательные вещества, витамины и/или минералы, достаточные для обеспечения роста микроорганизма. Предпочтительно, водная культуральная среда является минимальной анаэробной средой для микробиологического роста. Подходящие среды известны в данной области техники и описаны, например, в патенте США 5173429, патенте США 5593886 и WO 2002/008438.

Ферментацию целесообразно проводить в соответствующих условиях ферментации для получения продукта ферментации. Условия реакции, которые следует учитывать, включают давление, температуру, расход газа, скорость потока жидкости, pH среды, окислительно-восстановительный потенциал среды, скорость перемешивания (при использовании непрерывного реактора с мешалкой), уровень инокулированного материала, максимальные концентрации газового субстрата для обеспечения того, чтобы CO в жидкой фазе не становился ограничивающим, и максимальные концентрации продукта, чтобы избежать ингибирования продукта.

Кроме того, часто желательно увеличить концентрацию CO потока субстрата (или парциального давления CO в газообразном субстрате) и, таким образом, повысить эффективность реакций ферментации, в которых CO является субстратом. Работа при повышенных давлениях позволяет значительно увеличить скорость переноса CO из газовой фазы в жидкую фазу, где она может быть поглощена микроорганизмом в качестве источника углерода для осуществления ферментации. Это, в свою очередь, означает, что время удерживания (определяемое как объем жидкости в биореакторе, деленный на скорость потока входного газа) может быть уменьшено, если биореакторы поддерживаются при повышенном давлении, а не при атмосферном давлении. Оптимальные условия реакции будут частично зависеть от конкретного используемого микроорганизма по изобретению. Однако, как правило, предпочтительно, чтобы ферментацию проводили при давлении выше атмосферного. Кроме того, поскольку заданная скорость конверсии CO частично зависит от времени удержания субстрата и достижение требуемого времени удерживания, в свою очередь, диктует требуемый объем биореактора, использование систем под давлением может значительно уменьшить объем требуемого биореактора, и, следовательно, денежные затраты

на оборудование для ферментации. В соответствии с примерами, приведенными в патенте США 5593886, объем реактора может быть уменьшен в линейной пропорции к увеличению рабочего давления реактора, то есть биореакторы, работающие при давлении 10 атмосфер, должны составлять лишь одну десятую объема тех, которые работают при давлении в 1 атмосферу.

В качестве примера, были описаны преимущества проведения ферментации газ-этанол при повышенных давлениях. Например, в WO 2002/008438 описаны ферментации газ-этанол, проводимые при давлениях 30 фунтов/кв.дюйм изб. давления и 75 фунтов/кв.дюйм изб. давления, что дает производительность этанола 150 г/л/день и 369 г/л/день соответственно. Однако, в примерах ферментации, проводимых с использованием аналогичных сред и композиций входного газа при атмосферном давлении, было обнаружено, что продукция между 10 и 20 раз меньше этанола на литр в день.

Также желательно, чтобы скорость введения СО-содержащего газообразного субстрата контролировалась для обеспечения того, чтобы концентрация СО в жидкой фазе не становилась ограничивающей, поскольку продукты могут потребляться культурой в условиях ограниченного СО.

Состав газовых потоков, используемых для подачи в реакции ферментации, может оказать существенное влияние на эффективность и/или стоимость реакции. Например, O_2 может снизить эффективность анаэробного процесса ферментации. Обработка нежелательных или ненужных газов на стадиях ферментации до или после ферментации может увеличить нагрузку на такие стадии. Например, когда газовый поток сжимается перед поступлением в биореактор, ненужную энергию можно использовать для сжатия газов, которые не нужны в процессе ферментации. Соответственно, может оказаться желательным обрабатывать потоки субстрата, в частности потоки субстрата, полученные из промышленных источников, для удаления нежелательных компонентов и увеличения концентрации желаемых компонентов.

Примеры

Следующие примеры дополнительно иллюстрируют изобретение, но разумеется их не следует толковать как ограничение его объема.

Пример 1.

Этот пример описывает анализ путей ферментации карбоксидотрофных бактерий, таких как *C. autoethanogenum*, *C. ljungdahlii* или *C. ragsdalei*, для узких мест в производстве этанола и 2,3-бутандиола.

Для определения их активности анализировали стадии фермента оксидоредуктазы пути Вуд-Льюнгаля и пути ферментации этанола и 2,3-бутандиола. Реакции оксидоредуктазы являются особенно подходящими, поскольку они связаны с одним или более кофакторами, восстановление или окисление которых можно измерить. С этой целью также можно использовать синтетический окислительно-восстановительный краситель, такой как метилвиологен или бензилвиологен. Ферменты в этих путях участвуют в аутотрофном росте, включая поглощение и использование газов СО, СО₂ и Н₂, а также образование продукта.

Анализ ферментов и их активность подробно описаны на фиг. 1. Все анализы проводили с использованием синтетического окислительно-восстановительного красителя в качестве контроля, метилвиологена (MV), или бензилвиологена (BV). Затем тестировали кофакторы ферредоксин (Fd), НАДН и НАДФН или их комбинацию. Ферментные анализы проводили с использованием неочищенных экстрактов из ферментации, растущей аутотрофно на СО и водороде.

Ферментации с *C. autoethanogenum* проводили в 1,5 л биореакторах при 37°C с использованием СО-содержащего сталелитейного газа в качестве единственной энергии и источника углерода. Ферментные среды содержали, на литр, MgCl, CaCl₂ (0,5 mM), KCl (2 mM), H₃PO₄ (5 mM), Fe (100 мкM), Ni, Zn (5 мкM), Mn, B, W, Mo, и Se (2 мкM). Среду переносили в биореактор и автоклавировали при 121°C в течение 45 мин. После автоклавирования в среду добавляли тиамин, пантотенат (0,05 мг) и биотин (0,02 мг) и восстанавливали с 3 mM цистеин-HCl. Для достижения анаэробных условий, реакционный сосуд барботировали азотом через фильтр 0,2 мкм. Перед инокуляцией газ переключали на СО-содержащий газ сталелитейного завода, непрерывно подаваемый в реактор. Состав исходного газа был 2 % H₂, 42 % СО, 20 % СО₂ и 36 % N₂. Величину pH культуры поддерживали между 5 и 5,2.

Во время сбора клеток (биомасса 3,9 г клеток/л ферментационного бульона) расход газа составлял 5 моль СО л⁻¹·день⁻¹ и 10 миллимоль Н₂ л⁻¹·день⁻¹ при этом получали следующие метаболиты: 14 г ацетата л⁻¹·день⁻¹ и 19,5 г этанола л⁻¹·день⁻¹. pH культуры довели до pH 6 с помощью K₂CO₃, и реактор охлаждали на бане со льдом и водой. Приблизительно 1,2 л культуры собирали на льду. Культуру делили между двумя 1-литровыми центрифужными бутылками (эта и все последующие стадии проводились в анаэробной камере для обеспечения бескислородных условий, чтобы избежать инактивации ферментов) и клетки осаждались при 5000 об/мин в течение 10 мин. Надосадок декантировали и удаляли остаточную жидкость. Каждый осадок ресуспендировали приблизительно в 30 мл 50 mM KPO₄, pH 7,0, с 10 mM DTT. Ресуспендирования переносили на предварительно взвешенные пробирки 50 мл-Falcon и клетки отгоняли с максимальной скоростью (5000 г) в течение 15 мин. Пробирки удаляли из анаэробной камеры и сразу замораживали на жидком N₂ перед анализом.

Клетки собирали из непрерывного реактора в бескислородных условиях. Они были разрушены тремя продавливаниями через французский пресс. Не разрушенные клетки и клеточный мусор удаляли цен-

трифугированием при $20000\times g$ и 4°C в течение 30 мин. Надосадок использовали для анализа ферментов. За исключением указанных случаев, все анализы проводили при 37°C в 1,5-мл анаэробных кюветах, закрытых резиновой пробкой, заполненной 0,8 мл реакционной смеси и 0,7 мл N_2 или H_2 или CO при $1,2\times 10^5$ Па. Ферменты анализировали, как описано ниже, или описано Huang, J Bacteriol, 194: 3689-3699, 2012. После начала реакции с ферментом, восстановление НАД(Ф)⁺ или НАД⁺ контролировали спектрофотометрически при 340 нм ($\epsilon = 6,2 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) или при 380 нм ($\epsilon = 1,2 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), восстановление ферредоксина *C. pasteurianum* при 430 нм ($\epsilon_{\Delta\text{-red}} \approx 13,1 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), восстановление метилвиологена при 578 нм ($\epsilon = 9,8 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) и восстановление бензилвиологена при 578 нм ($\epsilon = 8,6 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$).

СО-дегидрогеназу измеряли, используя аналитическую смесь, которая содержала 100 мМ Трис/НСl (pH 7,5), 2 мМ DTT и около 30 мкМ ферредоксина и/или 1 мМ НАД⁺ или 1 мМ НАДФ⁺. Газовая фаза представляла собой 100% CO.

Активность гидрогеназы измеряли, используя аналитическую смесь 100 мМ Трис/НСl (pH 7,5) или 100 мМ фосфата калия, 2 мМ DTT и 25 мкМ ферредоксина и/или 1 мМ НАДФ⁺ и/или 10 мМ метилвиологена. Газовая фаза представляла собой 100% H_2 .

Форматно-водородную активность лиазы для восстановления CO_2 с H_2 до формиата измеряли с помощью аналитической смеси, содержащей 100 мМ фосфата калия, 2 мМ DTT и 30 мМ [^{14}C] K_2CO_3 (24000 dpm/μмоль). Газовая фаза представляла собой 100% H_2 . Бутылки сыворотки непрерывно встряхивали со скоростью 200 об/мин, чтобы обеспечить уравнивание газовой фазы с жидкой фазой. После начала реакции с ферментом, 100 мкл жидких образцов отбирали каждые 1,5 мин и добавляли в микробиологическую пробирку емкостью 1,5 мл, содержащую 100 мкл 150 мМ уксусной кислоты, для прекращения реакции подкислением. 200 мкл смеси затем инкубировали при 40°C в течение 10 мин при встряхивании при 1400 об/мин в термомиксере, чтобы удалить весь $^{14}\text{CO}_2$, оставляя образовавшийся ^{14}C -формиат. Затем 100 мкл смеси добавляли к 5 мл сцинтилляционной жидкости Quicksave A (Zinsser Analytic, Франкфурт, Германия) и анализировали на радиоактивность ^{14}C на жидком сцинтилляционном счетчике Beckman LS6500 (Фуллертон, Калифорния).

Измерение формиатдегидрогеназы проводили в аналитических смесях, содержащих 100 мМ Трис/НСl (pH 7,5) или 100 мМ фосфата калия, 2 мМ DTT, 20 мМ формиата и, где указано 25 мкМ ферредоксина, 1 мМ НАДФ⁺, 1 мМ НАД⁺ и/или 10 мМ метилвиологена. Газовая фаза представляла собой 100% N_2 .

Метилен- H_4F -дегидрогеназу измеряли, используя аналитическую смесь, содержащую 100 мМ MOPS/КОН (pH 6,5), 50 мМ 2-меркаптоэтанола, 0,4 мМ тетрагидрофолата, 10 мМ формальдегида и 0,5 мМ НАДФ⁺ или 0,5 мМ НАД⁺. Газовая фаза представляла собой 100% N_2 .

Метилен- H_4F -редуктазу анализировали в следующих условиях. Аналитические смеси содержали 100 мМ Трис/НСl (pH 7,5), 20 мМ аскорбата, 10 мкМ ФАД, 20 мМ бензилвиологена и 1 мМ метил- H_4F . Перед началом реакции с ферментом, бензилвиологен восстанавливали до ΔA555, равным 0,3 с дитионитом натрия.

Альдегид:ферредоксин-оксидоредуктазу анализировали, используя смесь, содержащую 100 мМ Трис/НСl (pH 7,5), 2 мМ DTT, 1,1 мМ ацетальдегида и около 25 мкМ ферредоксина. Газовая фаза представляла собой 100 % N_2 .

КоА-ацетилирование ацетальдегид дегидрогеназы измеряли, используя смесь, содержащую 100 мМ Трис/НСl (pH 7,5), 2 мМ DTT, 1,1 мМ ацетальдегида, 1 мМ кофермента А и 1 мМ НАДФ⁺ или 1 мМ НАД⁺. Газовая фаза представляла собой 100% N_2 .

Алкоголь и бутандиол дегидрогеназу измеряли в анализе с использованием 100 мМ фосфата калия (pH 6), 2 мМ DTT, 1,1 мМ ацетальдегида или ацетоина, соответственно, и 1 мМ НАДФН или 1 мМ НАДН. Газовая фаза представляла собой 100% N_2 .

Ферредоксин очищали из *C. pasteurianum*, как описано Schönheit, FEBS Lett, 89: 219-222, 1978.

Все анализы оксидоредуктазы на пути этанола и 2,3-бутандиола карбоксидотрофной бактерии *C. autoethanogenum* были проанализированы и успешно обнаружены, за исключением метилен-ТГФ-редуктазы, которая, по мнению авторов изобретения, требует еще неизвестного места связывания (Körke, PNAS USA, 107: 13087-13092, 2010; Poehlein, PLoS One, 7: e33439, 2012). Активность этого фермента ранее не могла быть обнаружена в других организмах. Результаты приведены на фиг. 1 и фиг. 2. Эти данные были использованы для анализа и определения узких мест в этих путях, которые обычно возникают во время процесса ферментации.

Пример 2.

Этот пример демонстрирует усиление потока через ферментационный путь.

Общие способы, описанные в примере 3 PCT/US 2014/041188, также могут быть использованы для введения гена пируват: ферредоксин-оксидоредуктазы, ацетолактатсинтазы и/или ацетолактат декарбоксилазы в рекомбинантный микроорганизм *Clostridium* по изобретению.

Пример 3.

Этот пример идентифицирует превращение ацетил-КоА в пируват с помощью пируват:ферредоксин-оксидоредуктазы в качестве узкого места в производстве 2,3-бутандиола.

Как видно из Фиг. 2 узким местом для получения 2,3-бутандиола является реакция ацетил-КоА на пируват, катализируемый пируват:ферредоксин-оксидоредуктазой. В то время как все другие измеренные реакции проявляли по меньшей мере активность 1,1 ед./мг, эта реакция с ограничением скорости проявляла ферментативную активность только 0,11 ед./мг (10%) в присутствии ферредоксина. Это на 90 % меньше, чем все другие реакции на пути. Чтобы хоть как-то преодолеть это узкое место и увеличить выход продукта от ферментации, эндогенный фермент пируват: ферредоксин-оксидоредуктаза может быть сверхэкспрессирован или может быть введен и экспрессирован экзогенный фермент пируват:ферредоксин-оксидоредуктазу.

Пример 4.

Этот пример демонстрирует усиление потока через путь продукции 2,3-бутандиола с помощью удаления узких мест.

Реакция, катализирующая превращение ацетил-КоА в пируват, изображенная на фиг. 2, является стадией, ограничивающей скорость образования 2,3-бутандиола в *C. autoethanogenum*, *C. ljungdahlii* или *C. gagsdalei*.

Это может быть преодолено сверхэкспрессией гена, кодирующего пируват:ферредоксин-оксидоредуктазу в *C. autoethanogenum*.

Ген является оптимизированным кодоном для минимизации проблем с экспрессией и предназначен для снижения гомологии с нативным геном для предотвращения нежелательных событий интеграции. Ген фланкирован сайтами рестриктазы, XbaI (3'-конец) и NheI (5'-конец) для субклонирования в pMTL83155. Синтезированный конструктор и pMTL83155 расщепляют с XbaI и NheI (Fermentas), и ген PFOR лигируют в pMTL83155 с ДНК-лигазой T4 (Fermentas). Лигирующую смесь используют для трансформации *E. coli* TOP10 (Invitrogen, Life Technologies), а колонии, содержащие желаемую плазмиду, идентифицируют с помощью плазмиды miniprep (Zymo Research) и рестрикционного расщепления (Fermentas). Желаемая плазида метилируется и трансформируется в *C. autoethanogenum*. Успешные трансформанты идентифицируют по устойчивости к тиамфениколу и анализу ПЦР с праймерами gerHF и CatR, которые будут давать продукт с 1584 парами, когда присутствует плазида.

Трансформанты, идентифицированные как содержащие желаемую плазмиду, выращивают в сывроточных флаконах, содержащих среду PETC-MES, в присутствии фабричного газа, и их продуцирование метаболитов, измеренное методом ВЭЖХ, сравнивают с продуцированием родительского микроорганизма, не содержащего плазмиду. Активность пируват:ферредоксин-оксидоредуктазы в трансформированном штамме также измеряется в неочищенных экстрактах, для подтверждения, что наблюдаемое узкое место в родительском штамме сглажено. Сверхэкспрессия пируват:ферредоксин-оксидоредуктазы увеличивает общую активность в клетке, сглаживает узкое место на пути и ведет к увеличению потока через пируват и увеличению продукции 2,3-бутандиола.

Пример 5.

Этот пример демонстрирует увеличение потока от пирувата к 2-гидрокси-2-метил-3-кетобутират (ацетолактат) посредством сверхэкспрессии нативной катаболической ацетолактатсинтазы.

Нативный катаболический ацетолактатсинтазный ген (*alsS*) *C. autoethanogenum* клонируют в сайты NdeI и NheI pMTL83155 (WO 2013/185123) для получения сверхэкспрессирующей плазмиды, экспрессирующей *alsS* под контролем промоторного участка оперона фосфотрансацетилаза-ацетаткиназы.

Сверхэкспрессирующая плазида может быть аналогичным образом получена с использованием катаболической ацетолактатсинтазы из другого микроорганизма, нативной анаболической ацетолактатсинтазы или анаболической ацетолактатсинтазы из другого микроорганизма.

Использование катаболической ацетолактатсинтазы из другого микроорганизма или анаболической ацетолактатсинтазы из другого микроорганизма может иметь более высокое сродство к пирувату и более быструю кинетику реакции. Анаболическая ацетолактатсинтаза из другого микроорганизма может быть ферментом, который идентифицирован как нечувствительный к ингибированию обратной связи. Малая субъединица анаболического ацетолактатсинтазного мутанта, который нечувствителен к ингибированию обратной связи, также может быть сверхэкспрессирована.

Плазмиду сверхэкспрессии вводят в *C. autoethanogenum*. Это приводит к штамму *C. autoethanogenum*, адаптированному для увеличения потока от пирувата до ацетолактата.

Пример 6.

Этот пример описывает метаболический инженерный подход к сверхэкспрессии пируват:ферредоксин-оксидоредуктазы, ацетолактатсинтазы и/или ацетолактат декарбоксилазы.

Для увеличения продукции 2,3-бутандиола пул пирувата, молекулы предшественника 2,3-бутандиола, был увеличен. Первой мишенью был ген PFOR, который кодирует фермент PFOR, который катализирует превращение ацетил-КоА в пируват. В геноме *C. autoethanogenum* есть две копии гена PFOR. Известно, что ген PFOR (CAETHG 0928) конститутивно экспрессируется на высоком уровне, тогда как другой ген (CAETHG 3029) активируется только в конце роста в периодической культуре (Körke, Appl Environ Microbiol, 77: 5467-5475, 2011). Таким образом, высоко экспрессированный ген PFOR был выбран для сверхэкспрессии.

Предполагается, что ацетолактатсинтаза, связывающая две молекулы пирувата с образованием α -

ацетолактата, существует в трех формах, кодируемых тремя различными генами у *C. autoethanogenum* и в близкородственных микроорганизмах (Körpe, PNAS USA, 107: 13087-13092, 2010; Körpe, Appl Environ Microbiol, 77: 5467-5475, 2011): одна катаболическая ацетолактатсинтаза и две формы анаболической ацетолактатсинтазы.

Предполагается, что ген *alsS* (CAETHG 1740) кодирует катаболическую ацетолактатсинтазу и участвует в образовании 2,3-бутандиола. Предполагается, что два гена *ilvBN* (CAETHG 0406) и *ilvH* (CAETHG 0124) кодируют анаболические ацетолактатсинтазы, которые, вероятно, будут участвовать в образовании аминокислот с разветвленной цепью.

α -ацетолактат декарбоксилируют до ацетоина посредством активности ацетолактат декарбоксилазы, кодируемой геном *alsD* (CAETHG 2932). Было обнаружено, что в других микроорганизмах уровни транскриптов гена *alsD* и активность ферментов регулируются концентрацией аминокислот с разветвленной цепью, присутствующих в клетке. Пока неизвестно, вызывает ли аминокислота с разветвленной цепью в *C. autoethanogenum* какое-либо ингибирование обратной транскрипции гена *alsD* или активность соответствующего фермента.

Стадия восстановления из ацетоина до 2,3-бутандиола под действием 2,3-бутандиолдегидрогеназы (EC 1.1.1.4) не является ступенью, ограничивающей скорость. Это было продемонстрировано в периодических и непрерывных культурах *C. autoethanogenum* путем добавления ацетоина к ферментационным средам. В периодических культурах добавляли до 40 г/л ацетоина и он количественно превращался в 2,3-бутандиол через 24 ч инкубации. Фактически, предполагаемый ген 2,3-бутандиолдегидрогеназы был экспрессирован конститутивно во время роста и в стационарной фазе в периодической культуре (Körpe, Appl Environ Microbiol, 77: 5467-5475, 2011). Кроме того, было показано, что *C. autoethanogenum* содержит строго НАДФН-зависимую первично-вторичную алкогольдегидрогеназу, которая также гидрирует ацетонин и другие кетоны до 2,3-бутандиола и других вторичных спиртов (Körpe, Catalyst Rev, 27: 7-12, 2014).

Три нативных гена, *PFOR*, *alsS* и *alsD*, были сверхэкспрессированы индивидуально и в комбинации *alsS-alsD* и в комбинации всех трех генов. Чтобы ввести гены в *C. autoethanogenum*, гены были клонированы в рекомбинантную плазмиду, которая несет ген устойчивости к антибиотикам в качестве селективного маркера. По этой причине контрольный штамм для этого набора экспериментов переносил плазмиду с геном устойчивости к антибиотику, но без какой-либо активной инсерции гена 2,3-бутандиола, поэтому он мог подвергаться воздействию стресса антибиотика и сравнен с характеристиками сверхэкспрессирующих штаммов. Важным аспектом сверхэкспрессии является выбор промотора для регуляции экспрессии вставленных генов. В этом исследовании был выбран промотор гена ферредоксина (P_{fdx}), так как он известен как один из самых сильных промоторов в *Clostridia*. Кроме того, чтобы избежать гомологичной рекомбинации между нативным геном в геноме и геном, присутствующим в плазмиде, последовательность ДНК добавленных генов была изменена в соответствии с патентованным процессом оптимизации (GeneOptimizer) ДНК-синтезирующей компании (GeneArt).

Четыре гетерологичных гена также были нацелены. Показано, что ген *PFOR*, выделенный из *Desulfovibrio africanus*, продуцирует фермент *PFOR*, который является высокостабильным в присутствии кислорода, который может быть выгодным при коммерческом анаэробном брожении (Pieulle, J Bacteriol, 179: 5684-5692, 1997). Также тестировали ген *alsS*, выделенный из *Bacillus subtilis*, и два гетерологичных гена *alsD*, выделенных из *Leuconostoc lactis* и из *Aeromonas hydrophila*. Ген *alsS*, выделенный из *Bacillus subtilis*, был использован для конструирования пути 2,3-бутандиола в ряде гетерологичных хозяев (Ng, Microb Cell Factories, 11: 68, 2012; Oliver, PNAS, 110: 1249-1254, 2013). Показано, что *alsD*, выделенный из *Aeromonas hydrophila*, обладает самой высокой ферментативной активностью среди нескольких других гетерологичных *alsD*, выделенных из других микроорганизмов в недавнем исследовании (Oliver, PNAS, 110: 1249-1254, 2013). Эти свойства делают эти гены идеальными кандидатами для генетических манипуляционных экспериментов.

Пример 7.

Этот пример описывает клонирование, конъюгацию и характеристику штаммов, сверхэкспрессирующих пируват:ферредоксин-оксидоредуктазу, ацетолактатсинтазу и/или ацетолактат декарбоксилазу.

В этом исследовании использовался штамм *C. autoethanogenum* LZ1561 (DSM23693). В качестве инструмента для генетической манипуляции использовались два штамма-донора *E. coli*; для клонирования плазмиды использовали штамм TOP 10 (Invitrogen), а штамм CA434 использовали для конъюгации с *C. autoethanogenum*.

Для избыточной экспрессии генов *PFOR*, *alsS* и *alsD* была выбрана челночная плаزمида *Clostridium-E.coli* серии pMTL83159 (4600 пар оснований) (Heap, J Microbiol Meth, 78: 79-85, 2009). Плазмиды были сконструированы так, чтобы содержать грамположительный репликон, грамотрицательный репликон, ген *traJ*, устойчивый к антибиотику ген, множественные сайты клонирования, расположенные в кодирующей последовательности *lacZ* альфа, и промотор гена ферредоксина (P_{fdx}). Грамположительный репликон (ген *repH*) происходит от плазмиды *C. butylicum* pCB102. Для клонирования плазмиды в *E. coli* грамотрицательный репликон ColE1 выбирали из-за большого количества копий продуцируемых плазмид. Ген *traJ* или ген переноса позволяет переносить генетический материал между клеткой-донором и клеткой-

реципиентом. Ген *catP*, кодирующий устойчивость к хлорамфениколу/тиамфениколу, был маркером выбора.

Три гена, *PFOR*, *alsS* и *alsD*, были синтезированы ДНК-синтезирующей компанией (GeneArt). Чтобы клонировать их в плазмиду *pMTL83159*, пару последовательностей распознавания рестрикционных ферментов и последовательности сайта связывания рибосомы добавляли к каждой последовательности гена и синтезировали вместе с этим геном. Исходные плазмиды, несущие ген, сначала трансформировали в штамм *E. coli* TOP 10. Для извлечения плазмид использовали плазмидный набор ZYPPY™ miniprep (Zymo Research). Для переноса целевого гена из его исходной плазмиды на плазмиду *pMTL83159* обе плазмиды разрезали с той же парой рестрикционных ферментов. Расщепленную ДНК разделяли с помощью гель-электрофореза на 0,6% агарозном геле, который работал при 75 вольтах в течение одного часа. После извлечения из геля плазмиды *pMTL83159* (вектор) и последовательности ДНК (вставки) каждого гена их лигировали вместе с использованием ДНК-лигазы T4 (Invitrogen). Лигированные плазмиды затем трансформировали в культуру *E. coli* Top10. Для обеспечения уверенности в том, что извлеченные плазмиды содержат вставку, 1 мкл плазмиды расщепляли подходящими рестрикционными ферментами, а расщепленную плазмиду затем разделяли гель-электрофорезом на 0,8% агарозном геле.

Плазмиды трансформировали в клетки-доноры *E. coli* CA434 и затем конъюгировали с *C. autoethanogenum*. Для подтверждения присутствия целевой плазмиды в трансформантах *C. autoethanogenum*, ПЦР проводили, используя образцы, взятые из культур в бутылках сыворотки.

Первоначальную характеристику всех штаммов сверхэкспрессии генов и разрушения генов сначала проводили в бутылках 1л-Schott для скрининга того, какой штамм продуцировал самую высокую концентрацию 2,3-бутандиола. Эти штаммы затем дополнительно тестировались в непрерывных культурах CSTR, что позволяет точно контролировать параметры ферментации, чтобы можно было рассчитать селективность метаболитов и биомассы.

Цели сверхэкспрессионных экспериментов заключались в сверхэкспрессии трех природных генов в пути 2,3-бутандиола индивидуально и в комбинациях двух и трех генов.

Сверхэкспрессирующий штамм	Доступность штамма	Доступность бутылок Schott	данных
Контроль плазмиды	+	+	
Нативный <i>PFOR</i>	+	+	
Нативный <i>AlsS</i>	+	+	
Нативный <i>AlsD</i>	+	+	
Нативный <i>AlsS-AlsD</i>	+	+	
Нативный <i>PFOR-AlsS-AlsD</i>	+	-	

В экспериментах с бутылками Schott контролировали ОП, концентрации метаболитов в средах, pH сред и давление в свободном пространстве в течение восьми дней, анализируя ежедневные образцы. В этот момент не наблюдалось никакого дальнейшего роста или значительной метаболической активности, pH всех культур упал до между 3,8 и 4 и не было измерено никакого дальнейшего потребления газа. Графическое представление профилей роста и метаболитов в зависимости от времени пяти штаммов показано на фиг. 5. В течение первых двух дней инкубации все пять штаммов с наличием данных по бутылкам Schott быстро росли. После этого скорость роста значительно снизилась, а затем прекратилась на 4-й день. Максимальные значения оптической плотности были приблизительно 0,75. Аналогично биомассе, концентрации уксусной кислоты резко возрастали в течение первых двух дней во всех культурах. Между 3-м днем и 4-м днем контрольная плазмиды и *alsS* сверхэкспрессирующий штамм, по-видимому, остановил всю метаболическую активность, поскольку никаких дальнейших изменений концентраций метаболитов не наблюдалось. Остальные три штамма демонстрировали активность до конца экспериментов.

Превращение ацетата в этанол (активность AOR) все еще можно было наблюдать у трех штаммов после замедления роста. Наиболее заметное падение содержания ацетата наблюдалось в сверхэкспрессирующем штамме *alsD*, и в результате этот штамм достиг наивысшей концентрации этанола, составляющей около 7 г/л. Два штамма, *alsD* и комбинированные *alsS-alsD* сверхэкспрессионные штаммы, продуцировали более высокие количества 2,3-бутандиола, чем другие штаммы, продуцируя большую часть его в течение фазы активного роста. После этого во время стационарной фазы с 4-го дня они продолжали производить 2,3-бутандиол медленными темпами до конца эксперимента на 8-й день. Сверхэкспрессионный *PFOR* штамм был другим штаммом, который продуцировал 2,3-бутандиол до более высокой концентрации, чем штамм контрольной плазмиды. В отличие от первых двух штаммов, сверхэкспрессионный *PFOR* штамм начал производить большую часть 2,3-бутандиола в начале стационарной фазы. Скорость производства была близка к скоростям двух других штаммов во время стационарной фазы.

Сверхэкспрессия только гена *alsS*, по-видимому, не увеличивала количество 2,3-бутандиола. Эти результаты показывают, что наблюдаемое увеличение количества 2,3-бутандиола связано в первую оче-

редь со сверхэкспрессией гена *alsD*. Сверхэкспрессия генов *alsS* и *alsD* привела к несколько более высокой концентрации 2,3-бутандиола, чем только избыточная экспрессия одного гена *alsD*. Положительный дополнительный эффект *alsS* может быть возможен. Сверхэкспрессия гена *PFOR*, по-видимому, способствовала более высокому продуцированию 2,3-бутандиола в течение стационарной фазы, где не наблюдалось никакого роста. Из-за всех этих положительных результатов и того факта, что никакого отрицательного эффекта не наблюдалось в этих штаммах, сверхэкспрессирующий штамм, несущий все три гена, был дополнительно испытан в непрерывной культуре в CSTR.

Чтобы исследовать весь потенциал микроба с использованием CO-содержащего газового субстрата, сверхэкспрессирующий штамм, несущий все три нативных гена и контрольный штамм плазмиды, был дополнительно охарактеризован на непрерывных культурах на основе CSTR. pH среды контролировали в течение всей ферментации, добавляя основание (5 М раствор NH_4OH) для компенсации образования кислоты и пополнения уровней азота в средах. Субстрат непрерывно подавали барботированием CO-содержащей газовой смеси через перемешиваемый ферментационный бульон. Газовый состав свежего входящего газа и использованного выходящего газа контролировался ежедневно с помощью газовой хроматографии. На основании различий в составе газа между втекающими и вытекающими газами, скоростью потока поступающего газа и объемом жидкости в процессе ферментации; рассчитывали использование газа и скорость синтеза продукта во время отбора проб. Значения выражены в моль/л/день.

ОП и концентрацию метаболитов измеряли три раза в день, и скорость разбавления и удельную скорость роста измеряли и подсчитывали ежедневно для определения продуктивности каждого метаболита. Селективность продукта для каждого метаболита рассчитывалась с использованием потребления CO, продукции CO_2 и продуктивности метаболитов. Для определения того, зависит ли селективность продукта от объемной производительности, были установлены скорости поглощения CO 4 моль/л/день и 8 моль/л/день. При поглощении CO 4 моль/л/день скорость разбавления системы поддерживалась на уровне 1 д^{-1} и удельной скорости роста при $0,5 \text{ д}^{-1}$. При более высоком поглощении CO 8 моль/л/день и, соответственно, более высоких скоростях образования метаболитов, скорость разбавления культуры повышалась до $1,7 \text{ д}^{-1}$, чтобы снизить концентрации метаболитов до того же диапазона, что и в экспериментах с 4 моль/л/день. Удельная скорость роста также была увеличена до $0,75 \text{ д}^{-1}$.

Метаболит и профиль газа комбинированного сверхэкспрессионного штамма *PFOR*, *alsS* и *alsD* и контрольного штамма плазмиды контролировали при поглощении CO 4 моль/л/день в течение 20 дней (фиг. 6). Хотя приготовление инокулята каждого штамма проходило через несколько циклов субкультивирования флакона сыворотки в регулярные промежутки времени, в культурах CSTR наблюдалась необычная, почти идентичная длинная лаг-фаза в пять дней. Примерно в день 5,5 обе культуры CSTR начали нормальный экспоненциальный рост (в течение нескольких часов друг от друга).

Несмотря на длительную лаг-фазу в обеих культурах и колебания в характере роста сверхэкспрессирующего штамма между днями 8 и 10, обе культуры поддерживались при стабильном поглощении газа 4 моль/л/день в течение 10 дней. При скорости разбавления 1 д^{-1} и удельной скорости роста $0,5 \text{ д}^{-1}$ требуется около шести дней для замены 95% бактериальной нагрузки в ферментерах. При постоянном поглощении газа, измеренного в течение этого периода, для анализа были использованы самые последние значения. Окончательные результаты показали, что сверхэкспрессирующий штамм последовательно продуцировал более высокие уровни 2,3-бутандиола по сравнению с контрольным штаммом плазмиды.

Профили метаболита и газовые профили сверхэкспрессирующей культуры контролировались при поглощении CO 8 моль/л/день в течение 11 дней (фиг. 7). Культуру инокулировали из культуры поглощения 4 моль/л/день CO. В этой культуре не наблюдалась лаг-фаза, и при экспоненциальном росте применялись соответствующий удельный расход CO и скорость разбавления, чтобы поддерживать культуру в оптимальных условиях выращивания. Поэтому стабильное продуцирование уксусной кислоты было достигнуто после третьего дня инкубации, в то время как другие метаболиты продолжали накапливаться. Мишень поглощения CO удваивалась с 4 моль/л/день до 8 моль/л/день.

Чтобы избежать ингибирования продукта, общая скорость разбавления культуры была увеличена с 1 д^{-1} до $1,7 \text{ д}^{-1}$ и удельный темп роста был увеличен пропорционально. Концентрации метаболита медленно увеличивались и достигали стабильного уровня производства через семь дней. Как поглощение водорода, так и поглощение CO, поддерживались стабильным образом в течение шести дней, указывая на то, что ферментация сверхэкспрессирующего штамма потенциально может стабильно работать в течение продолжительных периодов времени.

Среди жидких продуктов этанол был получен с самой высокой скоростью, за которой следовал ацетат. Конкретная стратегия подачи CO была направлена на поддержание определенного соотношения ацетата и этанола, что позволяет ферментации стабильно происходить в течение длительного периода времени. Штамм LZ1561 и контрольная плаزمида демонстрировали аналогичные профили 2,3-бутандиола и биомассы. Коэффициенты скорости продукции 2,3-бутандиола и биомассы в этих культурах составляли между 1,26 до 1,47. Однако, в сверхэкспрессирующем штамме это отношение составляло 2,45 при поглощении CO 4 моль/л/день и 2,24 при 8 моль/л/день поглощения CO культуры.

Штамм	LZ1561	Контроль	Сверхэкспрессия	LZ1561	Сверхэкспрессия
Скорость поглощения газа (моль/л/день)					
потребление CO	4	4	4	8	8
продукция CO ₂	2,45	2,53	2,43	4,53	4,34
Продукт					
Скорость продукции (10⁻³ моль/л/день)					
2,3-бутандиол	52	57	81	122	168
Биомасса	37	44	33	83	75
Этанол	447	450	367	798	823
Уксусная кислота	128	133	125	258	214

Селективность продукта для 2,3-бутандиола, биомассы, этанола и ацетата для сверхэкспрессии, контроля и штаммов LZ1561 была измерена при поглощении газа 4 моль/л/день и 8 моль/л/день. С оптимизированными параметрами ферментации более чем 50% углерода было направлено на образование этанола. Полученные данные показывают, что селективность 2,3-бутандиола в отношении сверхэкспрессирующего штамма увеличивалась от 15% в среднем в LZ1561 и в культурах контрольной плазмиды до 22,5%. Повышенная селективность 2,3-бутандиола в отношении сверхэкспрессирующего штамма, по-видимому, поддерживалась при различных скоростях поглощения CO. Повышение селективности 2,3-бутандиола способствует снижению селективности в отношении этанола при 4 моль/л/день или уменьшению селективности ацетата при 8 моль/л/день. Точный вклад этанола и ацетата не могут быть отделены, так как на их селективность легко влияют специфические подачи газа, которые, в свою очередь, легко зависят от небольших различий между параметрами работы. Например, pH, положение рабочего колеса, расположение зонда и другие могут повлиять на эти результаты.

Пример 8.

Этот пример демонстрирует экспрессию экзогенной ацетолактат декарбоксилазы для увеличения потока к 2,3-бутандиолу.

Ацетолактат декарбоксилазные гены из *A. hydrophila* и *L. lactis* синтезировали с кодонами, выбранными для экспрессии в *C. autoethanogenum* (GeneArt) и клонировали в pMTL83159, как описано выше. Полученные плазмиды и pMTL83159 в качестве контроля, трансформировали в *C. autoethanogenum* штамм LZ1561, как описано выше.

Штаммы выращивали в 1-литровых бутылках Schott, содержащих 40 мл среды PETC-MES, без дрожжевого экстракта, и объем воздушной камеры заменяли 1,5 бар (избыточное давление) синтетического фабричного газа (50% CO, 29% N₂, 18% CO₂ и 3% H₂) в качестве источника углерода и энергии. Для поддержания плазмиды добавляли 15 мг л⁻¹ тиамфеникола. Биомасса и концентрация метаболитов регистрировались за счет роста культур.

Экспрессия любой экзогенной ацетолактат декарбоксилазы приводила к увеличению продуцирования 2,3-бутандиола во время роста на синтетическом фабричном газе по сравнению со штаммом, несущим пустую плазмиду в качестве контроля. Экспрессия *alsD* из *A. hydrophila* и *L. lactis* привела к продуцированию соответственно 2,3±0,08 и 1,6±0,16 г л⁻¹ 2,3-бутандиола по сравнению с продуцированием 0,3±0,12 г л⁻¹ путём пустой-плазмиды-контрольного-штамма (фиг. 8).

Все ссылки, включая публикации, заявки на патенты и патенты, цитируемые в данном документе, включены в данное описание посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая ссылка была индивидуально и конкретно указана для включения посредством ссылки и была полностью изложена в данном документе. Ссылка на любой предшествующий уровень техники в этом описании не является и не должна восприниматься как подтверждение того, что этот уровень техники является частью общих знаний в области науки в любой стране.

Использование терминов в единственном числе и аналогичных референтов в контексте описания изобретения (особенно в контексте нижеследующей формулы изобретения) следует толковать как охватывающее единственное и множественное число, если иное не указано в данном документе или явно противоречит контексту. Термины "содержащий", "имеющий", "включающий" и "содержащий" должны толковаться как открытые термины (т. е. означать "включая, но не ограничиваясь ими"), если не указано иное.

Перечисление диапазонов величин в данном документе предназначено только для использования в качестве краткого способа для индивидуальной ссылки на каждое отдельное значение, попадающее в диапазон, если не указано иное в данном документе, и каждое отдельное значение включено в спецификацию, как если бы оно было индивидуально описано в данном документе. Все описанные в данном документе способы могут быть выполнены в любом подходящем порядке, если не указано иное или это

явно противоречит контексту. Использование любых и всех примеров или иллюстративного языка (например, "таких как"), предусмотренных в данном документе, предназначено только для лучшего освещения изобретения и не представляет собой ограничение объема изобретения, если не заявлено иное. Никакой язык в описании не должен толковаться как указывающий на любой незаявленный элемент как существенный для практики изобретения.

Предпочтительные варианты реализации данного изобретения описаны в данном документе, включая лучший способ, известный изобретателям для осуществления изобретения. Варианты этих предпочтительных вариантов реализации изобретения могут стать очевидными для специалистов в данной области техники после прочтения вышеприведенного описания. Изобретатели ожидают, что квалифицированные специалисты используют такие вариации, когда это необходимо, и изобретатели намереваются применять изобретение иначе, чем конкретно описано в данном документе. Соответственно, это изобретение включает все модификации и эквиваленты предмета, приведенного в формуле изобретения, прилагаемой к данному документу, как это допускается применимым законодательством. Кроме того, любая комбинация вышеописанных элементов во всех возможных его вариантах охватывает изобретение, если не указано иное в данном документе или это явно не противоречит контексту.

Перечень последовательностей

```
<110>  LanzaTech New Zealand Limited
        ЛАНЦАТЕК НЬЮ ЗИЛЭНД ЛИМИТЕД

<120>  РЕКОМБИНАНТНЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ, ПРОЯВЛЯЮЩИЕ
        ПОВЫШЕННЫЙ ПОТОК ПРИ ФЕРМЕНТАЦИОННОМ ПУТИ

<130>  LT113WO1

<150>  62/168,969
<151>  2015-06-01

<150>  62/089,053
<151>  2014-12-08

<160>  28

<170>  PatentIn version 3.5

<210>  1
<211>  3513
<212>  DNA
<213>  Clostridium autoethanogenum LZ1561

<400>  1
atgcgtaaaa tgaaaactat ggatggaaat actgctgctg cttatatattc ctatgcattt
60

actgatgtag cagctattta tccaataact ccatcatcac caatggcaga acatgtagat
120

gaatgggtag ctaagggaaa gaaaaatatt tttggacaac aagtaaaagt tatggagatg
180

caatcagagg ctggagcatc aggagccgta catggttcac tacaagcagg agcattgact
240

agtacatata ctgcatctca aggcttatta cttatgatac ctaacatgta taagattgct
300

ggtgaaattat taccaggagt attccatgta tcagctagag cagtagctgc aaattcactt
360

aacatatattg gtgatcacca agatgttatg gcaacaagac aaactggatt tgctttattt
420

gcagaaaagt cagtacaaca gggttatggat ctttcagcag tagcccatTT atcagcaata
480

aaaggaagag ttccatttgt aaacttcttt gatggattca gaacttctca tgaaattcaa
540

aaaatcgaat tattagagta tgaagaatta gcaaaattag ttgatcagaa agctttgaat
600

gatttttagaa gaagagcttt aaatccagat catccagtaa ctcggtgtac agctcaaaat
660

cctgatatat acttccagga aagagaagtt tcaaatacgt attacgaagc acttccagag
720
```

atagttgaag gatatatgca agaaatgact aaacttacag gaagagaata tcctctattc
 780
 aattactatg gagcaaaaga tgcagagaga attataatag ctatgggttc tgtctgtgaa
 840
 actgtagaag aagtaattga ttacttaacc acaaaagggtg aaaaagttgg attacttaca
 900
 gttcatttat atagaccatt ctcaataaaa cactttatga aatacatacc aaagactgtt
 960
 aagaaaattg cagtccttga tagaacaaaa gaaccaggat caattggaga acctctttat
 1020
 ttagatgtta agaatgcttt ctatggacaa gaagtacaac cagttatagt tgggtgaaga
 1080
 tatggacttg gttcaaaaga tgtattacca tcacatattc taccagtatt tgaaaactta
 1140
 aaatcagata aacctaagga tagatttaca ttaagtatag ttgatgatgt tacaataact
 1200
 tcattacctg taggagaaga tataaataca acaccagaag gaactacagc ttgtaagttc
 1260
 tggggactag gatcagatgg tactgttggg gcaaacaaga gtgctataaa gatcattgga
 1320
 gaccatacag atatgtatgc tcaaggatac tttgcatatg attcaaagaa atccgggtgt
 1380
 ataacagttt ctcatthaag atttggtaaa tcaccaataa aatcaccata tcttatagat
 1440
 aaggctgatt ttgttgcagt tcataaccaa tcttatgttc ataagtatga tgtacttgca
 1500
 ggacttaaaa aaggcggtaa cttcttatta aatacagttt ggactcaaga agaattggaa
 1560
 aaagagttac cagcttctat gaagaaatat atagcaaaca atgatataaa attctataca
 1620
 ttaaagtctg ttaaaatagc tcaagaaatt ggacttgggtg gaagaataaa tatgatatgt
 1680
 caatcagcat tctttaagat tgcaaatatc attccaatag atgatgctgt taagtactta
 1740
 aaagaagcag ttgtaacttc ttatggtaag aagggacaaa aagttgtaga tatgaataac
 1800
 gctgctatag acaagggcgt aaatgcagta gttaaaatag atgttccagc ttcattggaa
 1860
 gatgcagaag atgaagcagc agctacaaag gaacttccta aatttataga aaaaatagtt
 1920

aatcctatga atagacaaga aggagacaaa cttccagtaa gtgcatttgt aggaatggaa
1980

gatggtacat tcccagcagg aactgcagct tatgaaaaga gaggaatagc tataaatgtt
2040

ccagaatggc aagtagacaa atgtatacaa tgtaaccaat gttcatttgt atgtccacat
2100

gcagctataa gaccagttct tacaactgaa gaagaattag ctaaagcacc tcaaggattt
2160

gaagctaaag atgcaaatgg agcaaaagga cttaaattta caatggctat ttcaccactt
2220

gattgttcag gatgtggaaa ctgtgaagat gtatgtccag caaaagaaaa ggctcttgtt
2280

atgaagccag tagataactca gctgtcaaag acagaagctt gggattatgc tgtaaatgct
2340

gtagctcata aggataaccc aatgaaggac aaatacagtg taaaagcaag tcagttcgaa
2400

caaccattac ttgagttctc aggagcttgt gcaggatgcg gagaaactcc ttatgttaaa
2460

cttgtaactc aattgtttgg tgatagaatg atgatatcaa atgctacagg atgttcatca
2520

atttggggag catcagcacc agcaactcca tacacaacta actatagagg acatgggtcca
2580

tcttgggcta actcattatt tgaagacaat gctgaatatg gattaggtat gttccttggg
2640

gttaaacaga caagagaaag acttcaggat aaaattgaag aagctttaaa gggtagttaa
2700

agtgcagaac ttaaagctgc ttttgaagac tggattaaaa actttgctga aggtgaagga
2760

acaagagaaa gagctgataa aataacagct ttacttgaaa aagaaaaggg aagcaatgat
2820

ttattaaatg atatttatga aaacagagac ttcctagtaa agagatccca ctggataatt
2880

ggtggagacg gttggggcta tgatattgga tatggtggag tagatcatgt tttagcttca
2940

aatgaagatg taaatattct tgtacttgat acagaagtat attcaaatac aggtggacaa
3000

tcttcaaaat caactccaac agctgctgta gctaaatttg ctgcaagtgg taagaagact
3060

aagaagaaag atcttggat gatggctatg agttatggat atgtttatgt agctcagatt
3120

035950

tcaatgggtg ctgataagaa tcaggcatta aaggcaattc atgaagcaga agcttatcat
3180

ggaccatcac ttataatagc ttatgctcca tgtatcaatc atggcttaag agttggaatg
3240

ggtaagagcc agagagaagc taagagagct gttgattgtg gatattgggc actttacaga
3300

tacaatccag aattaaaaga agaaggaaaag aaatcattta gcttggattc aaaagaacca
3360

actacagatt tcaaggaatt cttaatggga gaagtaagat actcttcact tgctaaacaa
3420

ttcccagatc aggcagatgc attatttgaa aagactaaga aagatgctct tcaaagaatt
3480

gcaggatata aaaagcttga taatgaacag taa
3513

<210> 2
<211> 1170
<212> PRT
<213> Clostridium autoethanogenum LZ1561

<400> 2

Met Arg Lys Met Lys Thr Met Asp Gly Asn Thr Ala Ala Ala Tyr Ile
1 5 10 15

Ser Tyr Ala Phe Thr Asp Val Ala Ala Ile Tyr Pro Ile Thr Pro Ser
20 25 30

Ser Pro Met Ala Glu His Val Asp Glu Trp Val Ala Lys Gly Lys Lys
35 40 45

Asn Ile Phe Gly Gln Gln Val Lys Val Met Glu Met Gln Ser Glu Ala
50 55 60

Gly Ala Ser Gly Ala Val His Gly Ser Leu Gln Ala Gly Ala Leu Thr
65 70 75 80

Ser Thr Tyr Thr Ala Ser Gln Gly Leu Leu Leu Met Ile Pro Asn Met
85 90 95

Tyr Lys Ile Ala Gly Glu Leu Leu Pro Gly Val Phe His Val Ser Ala
100 105 110

Arg Ala Val Ala Ala Asn Ser Leu Asn Ile Phe Gly Asp His Gln Asp
115 120 125

035950

Val Met Ala Thr Arg Gln Thr Gly Phe Ala Leu Phe Ala Glu Ser Ser
130 135 140

Val Gln Gln Val Met Asp Leu Ser Ala Val Ala His Leu Ser Ala Ile
145 150 155 160

Lys Gly Arg Val Pro Phe Val Asn Phe Phe Asp Gly Phe Arg Thr Ser
165 170 175

His Glu Ile Gln Lys Ile Glu Leu Leu Glu Tyr Glu Glu Leu Ala Lys
180 185 190

Leu Val Asp Gln Lys Ala Leu Asn Asp Phe Arg Arg Arg Ala Leu Asn
195 200 205

Pro Asp His Pro Val Thr Arg Gly Thr Ala Gln Asn Pro Asp Ile Tyr
210 215 220

Phe Gln Glu Arg Glu Val Ser Asn Thr Tyr Tyr Glu Ala Leu Pro Glu
225 230 235 240

Ile Val Glu Gly Tyr Met Gln Glu Met Thr Lys Leu Thr Gly Arg Glu
245 250 255

Tyr His Leu Phe Asn Tyr Tyr Gly Ala Lys Asp Ala Glu Arg Ile Ile
260 265 270

Ile Ala Met Gly Ser Val Cys Glu Thr Val Glu Glu Val Ile Asp Tyr
275 280 285

Leu Thr Thr Lys Gly Glu Lys Val Gly Leu Leu Thr Val His Leu Tyr
290 295 300

Arg Pro Phe Ser Ile Lys His Phe Met Lys Tyr Ile Pro Lys Thr Val
305 310 315 320

Lys Lys Ile Ala Val Leu Asp Arg Thr Lys Glu Pro Gly Ser Ile Gly
325 330 335

Glu Pro Leu Tyr Leu Asp Val Lys Asn Ala Phe Tyr Gly Gln Glu Val
340 345 350

Gln Pro Val Ile Val Gly Gly Arg Tyr Gly Leu Gly Ser Lys Asp Val
355 360 365

Leu Pro Ser His Ile Leu Pro Val Phe Glu Asn Leu Lys Ser Asp Lys

035950

370		375		380
Pro Lys Asp Arg Phe Thr Leu Ser Ile Val Asp Asp Val Thr Asn Thr				
385		390		395 400
Ser Leu Pro Val Gly Glu Asp Ile Asn Thr Thr Pro Glu Gly Thr Thr				
	405		410	415
Ala Cys Lys Phe Trp Gly Leu Gly Ser Asp Gly Thr Val Gly Ala Asn				
	420		425	430
Lys Ser Ala Ile Lys Ile Ile Gly Asp His Thr Asp Met Tyr Ala Gln				
	435		440	445
Gly Tyr Phe Ala Tyr Asp Ser Lys Lys Ser Gly Gly Ile Thr Val Ser				
	450		455	460
His Leu Arg Phe Gly Lys Ser Pro Ile Lys Ser Pro Tyr Leu Ile Asp				
	465		470 475	480
Lys Ala Asp Phe Val Ala Val His Asn Gln Ser Tyr Val His Lys Tyr				
	485		490	495
Asp Val Leu Ala Gly Leu Lys Lys Gly Gly Asn Phe Leu Leu Asn Thr				
	500		505	510
Val Trp Thr Gln Glu Glu Leu Glu Lys Glu Leu Pro Ala Ser Met Lys				
	515		520	525
Lys Tyr Ile Ala Asn Asn Asp Ile Lys Phe Tyr Thr Leu Asn Ala Val				
	530		535	540
Lys Ile Ala Gln Glu Ile Gly Leu Gly Gly Arg Ile Asn Met Ile Cys				
	545		550 555	560
Gln Ser Ala Phe Phe Lys Ile Ala Asn Ile Ile Pro Ile Asp Asp Ala				
	565		570	575
Val Lys Tyr Leu Lys Glu Ala Val Val Thr Ser Tyr Gly Lys Lys Gly				
	580		585	590
Gln Lys Val Val Asp Met Asn Asn Ala Ala Ile Asp Lys Gly Val Asn				
	595		600	605
Ala Val Val Lys Ile Asp Val Pro Ala Ser Trp Lys Asp Ala Glu Asp				
	610		615	620

035950

Glu	Ala	Ala	Ala	Thr	Lys	Glu	Leu	Pro	Lys	Phe	Ile	Glu	Lys	Ile	Val	625	630	635	640
Asn	Pro	Met	Asn	Arg	Gln	Glu	Gly	Asp	Lys	Leu	Pro	Val	Ser	Ala	Phe	645	650	655	
Val	Gly	Met	Glu	Asp	Gly	Thr	Phe	Pro	Ala	Gly	Thr	Ala	Ala	Tyr	Glu	660	665	670	
Lys	Arg	Gly	Ile	Ala	Ile	Asn	Val	Pro	Glu	Trp	Gln	Val	Asp	Lys	Cys	675	680	685	
Ile	Gln	Cys	Asn	Gln	Cys	Ser	Phe	Val	Cys	Pro	His	Ala	Ala	Ile	Arg	690	695	700	
Pro	Val	Leu	Thr	Thr	Glu	Glu	Glu	Leu	Ala	Lys	Ala	Pro	Gln	Gly	Phe	705	710	715	720
Glu	Ala	Lys	Asp	Ala	Asn	Gly	Ala	Lys	Gly	Leu	Lys	Phe	Thr	Met	Ala	725	730	735	
Ile	Ser	Pro	Leu	Asp	Cys	Ser	Gly	Cys	Gly	Asn	Cys	Glu	Asp	Val	Cys	740	745	750	
Pro	Ala	Lys	Glu	Lys	Ala	Leu	Val	Met	Lys	Pro	Val	Asp	Thr	Gln	Leu	755	760	765	
Ser	Lys	Thr	Glu	Ala	Trp	Asp	Tyr	Ala	Val	Asn	Ala	Val	Ala	His	Lys	770	775	780	
Asp	Asn	Pro	Met	Lys	Asp	Lys	Tyr	Ser	Val	Lys	Ala	Ser	Gln	Phe	Glu	785	790	795	800
Gln	Pro	Leu	Leu	Glu	Phe	Ser	Gly	Ala	Cys	Ala	Gly	Cys	Gly	Glu	Thr	805	810	815	
Pro	Tyr	Val	Lys	Leu	Val	Thr	Gln	Leu	Phe	Gly	Asp	Arg	Met	Met	Ile	820	825	830	
Ala	Asn	Ala	Thr	Gly	Cys	Ser	Ser	Ile	Trp	Gly	Ala	Ser	Ala	Pro	Ala	835	840	845	
Thr	Pro	Tyr	Thr	Thr	Asn	Tyr	Arg	Gly	His	Gly	Pro	Ser	Trp	Ala	Asn	850	855	860	

035950

Ser Leu Phe Glu Asp Asn Ala Glu Tyr Gly Leu Gly Met Phe Leu Gly
865 870 875 880

Val Lys Gln Thr Arg Glu Arg Leu Gln Asp Lys Ile Glu Glu Ala Leu
885 890 895

Lys Gly Ser Leu Ser Ala Glu Leu Lys Ala Ala Phe Glu Asp Trp Ile
900 905 910

Lys Asn Phe Ala Glu Gly Glu Gly Thr Arg Glu Arg Ala Asp Lys Ile
915 920 925

Thr Ala Leu Leu Glu Lys Glu Lys Gly Ser Asn Asp Leu Leu Asn Asp
930 935 940

Ile Tyr Glu Asn Arg Asp Phe Leu Val Lys Arg Ser His Trp Ile Ile
945 950 955 960

Gly Gly Asp Gly Trp Gly Tyr Asp Ile Gly Tyr Gly Gly Val Asp His
965 970 975

Val Leu Ala Ser Asn Glu Asp Val Asn Ile Leu Val Leu Asp Thr Glu
980 985 990

Val Tyr Ser Asn Thr Gly Gly Gln Ser Ser Lys Ser Thr Pro Thr Ala
995 1000 1005

Ala Val Ala Lys Phe Ala Ala Ser Gly Lys Lys Thr Lys Lys Lys
1010 1015 1020

Asp Leu Gly Met Met Ala Met Ser Tyr Gly Tyr Val Tyr Val Ala
1025 1030 1035

Gln Ile Ser Met Gly Ala Asp Lys Asn Gln Ala Leu Lys Ala Ile
1040 1045 1050

His Glu Ala Glu Ala Tyr His Gly Pro Ser Leu Ile Ile Ala Tyr
1055 1060 1065

Ala Pro Cys Ile Asn His Gly Leu Arg Val Gly Met Gly Lys Ser
1070 1075 1080

Gln Arg Glu Ala Lys Arg Ala Val Asp Cys Gly Tyr Trp Ala Leu
1085 1090 1095

035950

Tyr Arg Tyr Asn Pro Glu Leu Lys Glu Glu Gly Lys Lys Ser Phe
1100 1105 1110

Ser Leu Asp Ser Lys Glu Pro Thr Thr Asp Phe Lys Glu Phe Leu
1115 1120 1125

Met Gly Glu Val Arg Tyr Ser Ser Leu Ala Lys Gln Phe Pro Asp
1130 1135 1140

Gln Ala Asp Ala Leu Phe Glu Lys Thr Lys Lys Asp Ala Leu Gln
1145 1150 1155

Arg Ile Ala Gly Tyr Lys Lys Leu Asp Asn Glu Gln
1160 1165 1170

<210> 3

<211> 3538

<212> DNA

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Оптимизированная по кодону пируват:ферредоксин-оксидоредуктаза,
Clostridium autoethanogenum LZ1561

<400> 3

tctagaagga ggtaactaaa tgagaaaaat gaaaactatg gatggaaata ctgcagcagc
60

atatataagt tatgcattta ctgatgtagc agcaatatat cctataactc ctagtagtcc
120

tatggcagaa catgtagatg aatgggtagc aaaaggaaaa aaaaatatat ttggacaaca
180

agtaaaagta atggaaatgc aaagtgaagc tggagcaagt ggagcagtac atggaagttt
240

acaagctgga gcattaacta gtacttatac tgcaagtcaa ggattattat taatgatacc
300

taatatgtat aaaatagctg gagaattatt acctggagta tttcatgtaa gtgcaagagc
360

agtagcagca aatagtttaa atatatttgg agatcatcaa gatgtaatgg caactagaca
420

aactggattt gcattatttg cagaaagtag tgtacaacaa gtaatggatt taagtgcagt
480

agcacattta agtgcaataa aaggaagagt accttttgta aatttttttg atggatttag
540

aactagtcac gaaatacaaa aaatagaatt attagaatat gaagaattag caaaattagt
600

agatcaaaaa gcattaaatg attttagaag aagagcatta aatcctgac atcctgtaac
660

tagaggaact gcacaaaatc ctgatata ttttcaagaa agagaagtaa gtaataactta
720

ttatgaagca ttacctgaaa tagtagaagg atatatgcaa gaaatgacta aattaactgg
780

aagagaatat cttttattta attattatgg agcaaaagat gcagaaagaa taataatagc
840

aatgggaagt gtatgtgaaa ctgtagaaga agtaatagat tatttaacta ctaaaggaga
900

aaaagtagga ttattaactg tacatttata tagacctttt agtataaaac attttatgaa
960

atatatacct aaaactgtaa aaaaaatagc agtattagat agaactaaag aacctggaag
1020

tataggagaa cctttatatt tagatgtaaa aaatgctttt tatggacaag aagtacaacc
1080

tgtaatagtt ggaggaagat atggattagg atctaaagat gtattaccta gtcatatatt
1140

acctgtattt gaaaatttaa aaagtataa acctaaagat agatttactt taagtatagt
1200

agatgatgta actaatacta gtttacctgt tggagaagat ataaatacta ctctgaagg
1260

aactactgca tgtaaatttt ggggattagg aagtgatgga actgttgagg caaataaatc
1320

tgcaataaaa ataataggag atcatactga tatgtatgca caaggatatt ttgcttatga
1380

tagtaaaaaa agtggaggaa taactgtaag tcatttaaga tttggaaaaa gtcctataaa
1440

aagtccttat ttaatagata aagcagattt tgtagcagta cataatcaa gttatgttca
1500

taaatatgat gtattagcag gattaaaaaa aggaggaaat tttttattaa atactgtatg
1560

gactcaagaa gaattagaaa aagaattacc tgcaagtatg aaaaagtata tagcaaataa
1620

tgatataaag ttttatactt taaatgcagt aaaaatagca caagaaatag gattaggagg
1680

aagaataaat atgatatgtc aaagtgcatt ttttaaaata gcaaatataa tacctataga
1740

tgatgcagta aaatatttaa aagaagcagt agtaactagt tatggaaaaa aaggacaaaa
1800

agttgtagat atgaataatg cagcaataga taaaggagta aatgcagtag taaaaataga
 1860

tgtacctgca agttggaaaag atgctgaaga tgaagcagca gcaactaaaag aattacctaa
 1920

atttatagaa aaaatagtaa atcctatgaa tagacaagaa ggagataaat tacctgtaag
 1980

tgcatttgta ggaatggaag atggaacttt tcctgctgga actgcagctt atgaaaaaag
 2040

aggaatagca ataaatgtac ctgaatggca agtagataaa tgtatacaat gtaatcaatg
 2100

tagttttgta tgtcctcatg cagcaataag acctgtatta actactgaag aagaattagc
 2160

taaagcacct caaggatttg aagctaaaaga tgcaaatgga gctaaaggat taaaatttac
 2220

tatggcaata agtccttttag attgtagtgg atgtggaaat tgtgaagatg tatgtcctgc
 2280

aaaagaaaaa gcattagtaa tgaaacctgt agatactcaa ttaagtaaaa ctgaagcatg
 2340

ggattatgca gtaaatgctg tagcacataa agataatcct atgaaagata aatatagtgt
 2400

aaaagcaagt caatttgaac aacctttatt agaatttagt ggagcatgtg caggatgtgg
 2460

agaaaactcct tatgtaaaat tagtaactca attatttgga gatagaatga tgatagcaaa
 2520

tgcaactgga tgtagtagta tatggggagc aagtgtcctt gcaactcctt atactactaa
 2580

ttatagagga catggaccta gttgggcaaa ttctttatct gaagataatg cagaatatgg
 2640

attaggaatg tttttaggag taaaacaaac tagagaaaaga ttacaagata aaatagaaga
 2700

agcattaaaa ggatctttta gtgcagaatt aaaagcagca tttgaagatt ggataaaaaa
 2760

ttttgcagaa ggagaaggaa caagagaaaag agcagataaa ataactgcat tattagaaaa
 2820

agaaaaagga tctaattgatt tattaatatga tatatatgaa aatagagatt ttttagtaaa
 2880

aagaagtcac ttgataatag gaggagatgg atggggatat gatataggat atggaggagt
 2940

agatcatgta ttagcaagta atgaagatgt aaatatatta gtattagata ctgaagtata
 3000

tagtaatact ggaggacaaa gtagtaaaag tactcctact gcagcagtag caaaatttgc
3060

agcaagtgga aaaaaaacta aaaaaaaaga tttaggaatg atggcaatga gttatggata
3120

tgtatatgta gcacaaataa gtatgggagc tgataaaaat caagctttta aagcaatata
3180

tgaagctgaa gcatatcatg gaccaagttt aataatagct tatgcacctt gtataaatca
3240

tggattaaga gtaggaatgg gaaaaagtca aagagaagca aaaagagcag tagattgtgg
3300

atattgggca ttatatagat ataatcctga attaaaagaa gaaggaaaaa aatcttttag
3360

tttagatagt aaagaaccta ctactgattt taaagaattt ttaatgggag aagtaagata
3420

tagtagttta gcaaaacaat ttcctgatca agcagatgct ttatttgaaa aaacaaaaaa
3480

agatgcatta caaagaatag ctggatataa aaaattagat aatgaacaat aagctagc
3538

<210> 4

<211> 1170

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Оптимизированная по кодону пируват:ферредоксин-оксидоредуктаза,
Clostridium autoethanogenum LZ1561

<400> 4

Met Arg Lys Met Lys Thr Met Asp Gly Asn Thr Ala Ala Ala Tyr Ile
1 5 10 15

Ser Tyr Ala Phe Thr Asp Val Ala Ala Ile Tyr Pro Ile Thr Pro Ser
20 25 30

Ser Pro Met Ala Glu His Val Asp Glu Trp Val Ala Lys Gly Lys Lys
35 40 45

Asn Ile Phe Gly Gln Gln Val Lys Val Met Glu Met Gln Ser Glu Ala
50 55 60

Gly Ala Ser Gly Ala Val His Gly Ser Leu Gln Ala Gly Ala Leu Thr
65 70 75 80

Ser Thr Tyr Thr Ala Ser Gln Gly Leu Leu Leu Met Ile Pro Asn Met
85 90 95

035950

Tyr Lys Ile Ala Gly Glu Leu Leu Pro Gly Val Phe His Val Ser Ala
 100 105 110

Arg Ala Val Ala Ala Asn Ser Leu Asn Ile Phe Gly Asp His Gln Asp
 115 120 125

Val Met Ala Thr Arg Gln Thr Gly Phe Ala Leu Phe Ala Glu Ser Ser
 130 135 140

Val Gln Gln Val Met Asp Leu Ser Ala Val Ala His Leu Ser Ala Ile
 145 150 155 160

Lys Gly Arg Val Pro Phe Val Asn Phe Phe Asp Gly Phe Arg Thr Ser
 165 170 175

His Glu Ile Gln Lys Ile Glu Leu Leu Glu Tyr Glu Glu Leu Ala Lys
 180 185 190

Leu Val Asp Gln Lys Ala Leu Asn Asp Phe Arg Arg Arg Ala Leu Asn
 195 200 205

Pro Asp His Pro Val Thr Arg Gly Thr Ala Gln Asn Pro Asp Ile Tyr
 210 215 220

Phe Gln Glu Arg Glu Val Ser Asn Thr Tyr Tyr Glu Ala Leu Pro Glu
 225 230 235 240

Ile Val Glu Gly Tyr Met Gln Glu Met Thr Lys Leu Thr Gly Arg Glu
 245 250 255

Tyr His Leu Phe Asn Tyr Tyr Gly Ala Lys Asp Ala Glu Arg Ile Ile
 260 265 270

Ile Ala Met Gly Ser Val Cys Glu Thr Val Glu Glu Val Ile Asp Tyr
 275 280 285

Leu Thr Thr Lys Gly Glu Lys Val Gly Leu Leu Thr Val His Leu Tyr
 290 295 300

Arg Pro Phe Ser Ile Lys His Phe Met Lys Tyr Ile Pro Lys Thr Val
 305 310 315 320

Lys Lys Ile Ala Val Leu Asp Arg Thr Lys Glu Pro Gly Ser Ile Gly
 325 330 335

035950

Glu Pro Leu Tyr Leu Asp Val Lys Asn Ala Phe Tyr Gly Gln Glu Val
340 345 350

Gln Pro Val Ile Val Gly Gly Arg Tyr Gly Leu Gly Ser Lys Asp Val
355 360 365

Leu Pro Ser His Ile Leu Pro Val Phe Glu Asn Leu Lys Ser Asp Lys
370 375 380

Pro Lys Asp Arg Phe Thr Leu Ser Ile Val Asp Asp Val Thr Asn Thr
385 390 395 400

Ser Leu Pro Val Gly Glu Asp Ile Asn Thr Thr Pro Glu Gly Thr Thr
405 410 415

Ala Cys Lys Phe Trp Gly Leu Gly Ser Asp Gly Thr Val Gly Ala Asn
420 425 430

Lys Ser Ala Ile Lys Ile Ile Gly Asp His Thr Asp Met Tyr Ala Gln
435 440 445

Gly Tyr Phe Ala Tyr Asp Ser Lys Lys Ser Gly Gly Ile Thr Val Ser
450 455 460

His Leu Arg Phe Gly Lys Ser Pro Ile Lys Ser Pro Tyr Leu Ile Asp
465 470 475 480

Lys Ala Asp Phe Val Ala Val His Asn Gln Ser Tyr Val His Lys Tyr
485 490 495

Asp Val Leu Ala Gly Leu Lys Lys Gly Gly Asn Phe Leu Leu Asn Thr
500 505 510

Val Trp Thr Gln Glu Glu Leu Glu Lys Glu Leu Pro Ala Ser Met Lys
515 520 525

Lys Tyr Ile Ala Asn Asn Asp Ile Lys Phe Tyr Thr Leu Asn Ala Val
530 535 540

Lys Ile Ala Gln Glu Ile Gly Leu Gly Gly Arg Ile Asn Met Ile Cys
545 550 555 560

Gln Ser Ala Phe Phe Lys Ile Ala Asn Ile Ile Pro Ile Asp Asp Ala
565 570 575

035950

Val Lys Tyr Leu Lys Glu Ala Val Val Thr Ser Tyr Gly Lys Lys Gly
580 585 590

Gln Lys Val Val Asp Met Asn Asn Ala Ala Ile Asp Lys Gly Val Asn
595 600 605

Ala Val Val Lys Ile Asp Val Pro Ala Ser Trp Lys Asp Ala Glu Asp
610 615 620

Glu Ala Ala Ala Thr Lys Glu Leu Pro Lys Phe Ile Glu Lys Ile Val
625 630 635 640

Asn Pro Met Asn Arg Gln Glu Gly Asp Lys Leu Pro Val Ser Ala Phe
645 650 655

Val Gly Met Glu Asp Gly Thr Phe Pro Ala Gly Thr Ala Ala Tyr Glu
660 665 670

Lys Arg Gly Ile Ala Ile Asn Val Pro Glu Trp Gln Val Asp Lys Cys
675 680 685

Ile Gln Cys Asn Gln Cys Ser Phe Val Cys Pro His Ala Ala Ile Arg
690 695 700

Pro Val Leu Thr Thr Glu Glu Glu Leu Ala Lys Ala Pro Gln Gly Phe
705 710 715 720

Glu Ala Lys Asp Ala Asn Gly Ala Lys Gly Leu Lys Phe Thr Met Ala
725 730 735

Ile Ser Pro Leu Asp Cys Ser Gly Cys Gly Asn Cys Glu Asp Val Cys
740 745 750

Pro Ala Lys Glu Lys Ala Leu Val Met Lys Pro Val Asp Thr Gln Leu
755 760 765

Ser Lys Thr Glu Ala Trp Asp Tyr Ala Val Asn Ala Val Ala His Lys
770 775 780

Asp Asn Pro Met Lys Asp Lys Tyr Ser Val Lys Ala Ser Gln Phe Glu
785 790 795 800

Gln Pro Leu Leu Glu Phe Ser Gly Ala Cys Ala Gly Cys Gly Glu Thr
805 810 815

Pro Tyr Val Lys Leu Val Thr Gln Leu Phe Gly Asp Arg Met Met Ile

035950

820	825	830
Ala Asn Ala Thr Gly Cys Ser Ser Ile Trp Gly Ala Ser Ala Pro Ala		
835	840	845
Thr Pro Tyr Thr Thr Asn Tyr Arg Gly His Gly Pro Ser Trp Ala Asn		
850	855	860
Ser Leu Phe Glu Asp Asn Ala Glu Tyr Gly Leu Gly Met Phe Leu Gly		
865	870	875
		880
Val Lys Gln Thr Arg Glu Arg Leu Gln Asp Lys Ile Glu Glu Ala Leu		
	885	890
		895
Lys Gly Ser Leu Ser Ala Glu Leu Lys Ala Ala Phe Glu Asp Trp Ile		
	900	905
		910
Lys Asn Phe Ala Glu Gly Glu Gly Thr Arg Glu Arg Ala Asp Lys Ile		
	915	920
		925
Thr Ala Leu Leu Glu Lys Glu Lys Gly Ser Asn Asp Leu Leu Asn Asp		
	930	935
		940
Ile Tyr Glu Asn Arg Asp Phe Leu Val Lys Arg Ser His Trp Ile Ile		
945	950	955
		960
Gly Gly Asp Gly Trp Gly Tyr Asp Ile Gly Tyr Gly Gly Val Asp His		
	965	970
		975
Val Leu Ala Ser Asn Glu Asp Val Asn Ile Leu Val Leu Asp Thr Glu		
	980	985
		990
Val Tyr Ser Asn Thr Gly Gly Gln Ser Ser Lys Ser Thr Pro Thr Ala		
	995	1000
		1005
Ala Val Ala Lys Phe Ala Ala Ser Gly Lys Lys Thr Lys Lys Lys		
1010	1015	1020
Asp Leu Gly Met Met Ala Met Ser Tyr Gly Tyr Val Tyr Val Ala		
1025	1030	1035
Gln Ile Ser Met Gly Ala Asp Lys Asn Gln Ala Leu Lys Ala Ile		
1040	1045	1050
His Glu Ala Glu Ala Tyr His Gly Pro Ser Leu Ile Ile Ala Tyr		
1055	1060	1065

035950

Ala Pro Cys Ile Asn His Gly Leu Arg Val Gly Met Gly Lys Ser
1070 1075 1080

Gln Arg Glu Ala Lys Arg Ala Val Asp Cys Gly Tyr Trp Ala Leu
1085 1090 1095

Tyr Arg Tyr Asn Pro Glu Leu Lys Glu Glu Gly Lys Lys Ser Phe
1100 1105 1110

Ser Leu Asp Ser Lys Glu Pro Thr Thr Asp Phe Lys Glu Phe Leu
1115 1120 1125

Met Gly Glu Val Arg Tyr Ser Ser Leu Ala Lys Gln Phe Pro Asp
1130 1135 1140

Gln Ala Asp Ala Leu Phe Glu Lys Thr Lys Lys Asp Ala Leu Gln
1145 1150 1155

Arg Ile Ala Gly Tyr Lys Lys Leu Asp Asn Glu Gln
1160 1165 1170

<210> 5

<211> 3725

<212> DNA

<213> Desulfovibrio africanus

<400> 5

tctagataag gaggtcggac atgggaaaaa aaatgatgac tactgatgga aatactgcaa
60

ctgcacatgt agcttatgca atgagtgaag tagcagcaat atatcctata actcctagta
120

gtactatggg agaagaagca gacgattggg cagcacaggg aagaaaaaat atatttggac
180

aaactttaac tataagagaa atgcaaagtg aagctggtgc tgctggtgca gtacatggtg
240

cattagcagc tgggtgatta actactactt ttactgcaag tcagggatta ttacttatga
300

tacctaatat gtacaaaata agtgggtgaat tattacctgg tgtatttcat gtaactgcaa
360

gagcaatagc agcacatgca cttagtatat ttggagatca tcaagatata tatgcagcaa
420

gacagactgg atttgcaatg ttagcaagta gtagtgtaca agaggcacat gatatggcac
480

ttgtagcaca tttagcagca atagaaagta atgtaccttt tatgcatttt tttgatggat
540

ttagaactag tcatgaaata caaaaaatag aagtattaga ttatgcagat atggcaagtt
600

tagtaaatca aaaagcatta gcagaattta gagcaaaaag tatgaatcct gaacatcctc
660

atgtaagagg aactgcacaa aatcctgata tatatcttca gggaagagaa gcagcaaadc
720

cttattatct taaagtacct ggaatagtag ctgaatatat gcaaaaagta gcaagtttaa
780

ctggaagaag ttataaactt tttgattatg ttggagcacc tgatgcagaa agggtaatat
840

taagtatggg aagtagttgt gaaactatat aagaagtaat aaatcatctt gcagcaaaaag
900

gtgaaaaaat aggacttata aaagtaagac tttatagacc ttttgtaagt gaagcatttt
960

ttgcagcatt acctgcaagt gcaaaaagtaa taactgtatt agatagaact aaagaacctg
1020

gtgcacctgg tgatccttta tatcttgatg tatgtagtgc attttagtaa aggggtgaag
1080

caatgcctaa aatacttgct ggaagatatg gattaggaag taaagaattt agtcctgcaa
1140

tggtaaaaag tgtatatgat aatatgagtg gtgcaaaaaa aaatcatttc actgtaggaa
1200

tagaagatga tgtaactgga actagtttac ctgtagataa tgcatttgca gatactactc
1260

ctaaagggtac tatacaatgt caattttggg gacttggagc agatggaact gttggagcaa
1320

ataaacaagc aataaaaaata attggagata atactgattt atttgcacaa ggatatttta
1380

gttatgatag taaaaaaagt ggtggaataa ctataagtca ttttaagattt ggagaaaaac
1440

ctatacaaag tacttattta gtaaatagag cagattatgt agcatgtcat aatcctgctt
1500

atgtaggaat atatgatata ttagaaggta taaaagatgg tggaactttt gtacttaata
1560

gtccttggag tagtttagaa gatatggata aacatttacc tagtggaata aaaagaacta
1620

tagcaaataa gaaattaaaa ttttataata tagatgcagt aaaaatagca actgatgtag
1680

gattaggtgg aagaataaat atgataatgc aaactgcatt ttttaaatta gctggtgtat
1740

taccttttga aaaagcagta gatttattaa aaaaaagtat acataaagct tatggaaaaa
1800

aaggtgaaaa aattgtaaaa atgaatactg atgcagtaga tcaagcagta actagtttac
1860

aagaatttaa atatcctgat agttggaaa atgcaccagc agaaactaaa gcagaaccta
1920

tgactaatga atttttttaa aatgtagtaa aacctatatt aactcaacaa ggtgataaat
1980

tacctgtatc tgcatttgaa gcagatggaa gatttcctct tggaactagt caatttgaaa
2040

aaagaggtgt agctataaac gtacctcagt gggttcctga aaattgtata cagtgtaatc
2100

aatgtgcatt tgtatgtcct catagtgcaa tacttccagt attagcaaaa gaagaagaat
2160

tagttggagc accagcaaat tttactgcac ttgaagcaaa gggaaaagaa cttaaaggat
2220

ataaathtag aatacagata aatactttag attgtatggg atgtggaaat tgtgcagata
2280

tatgtcctcc taaagaaaaa gcacttgtaa tgcagcctct tgatactcaa agagatgcac
2340

aagtacctaa tttagaatat gcagctagaa tacctgtaaa aagtgaagta ttacctagag
2400

atagttttaa aggatctcaa tttcaagaac ctttaatgga atttagtggt gcatgtagtg
2460

gatgtgggtga aactccttat gtaagagtaa taactcaatt atttggagaa agaattgtta
2520

tagcaaatgc aactggatgt agtagtatat ggggagcaag tgcacctagt atgccttata
2580

aaactaatag acttggacaa ggacctgcat ggggaaatag tttatttgaa gatgcagcag
2640

aatatggatt tggaatgaat atgagtatgt ttgcaagaag aactcattta gcagatttag
2700

ctgcaaaaagc attagaaaagt gatgcaagtg gtgatgtaaa agaagcatta caaggttggt
2760

tagctggaaa aaatgatcct ataaaaagta aagaatatgg tgataaactt aaaaaacttt
2820

tagcaggaca aaaagatgga ttattaggac aaatagcagc aatgagtgat ctttatacta
2880

035950

aaaaaagtgt atggatatatt ggaggtgatg gatgggctta tgatatagga tatgggtggac
2940

ttgatcatgt acttgcacat ggtgaagatg taaatgtatt tgtaatggat actgaagtat
3000

atagtaatac tgggtggacaa agtagtaaag caactcctac tgggtgcagta gcaaaatttg
3060

cagcagctgg aaaaagaact ggaaaaaaag atttagcaag aatggtaatg acttatggat
3120

atgtatatgt agcaactgta tctatgggat atagtaaaca acaatttctt aaagtattaa
3180

aagaagcaga aagttttcct ggacctagtt tagtaatagc ttatgctact tgtataaatc
3240

aaggattaag aaaaggatg ggaaaaagtc aagatgtaat gaatactgca gtaaaaagtg
3300

gatattggcc tttattttaga tatgatccta gacttgcagc tcagggaaaa aatccttttc
3360

aattagatag taaagcacct gatggaagtg tagaagaatt tcttatggca caaaatagat
3420

ttgcagtact tgatagaagt tttcctgaag atgcaaaaag attaagagca caagtagcac
3480

atgaattaga tgtaagattt aaagaattag aacacatggc agcaactaat atatttgaaa
3540

gttttgcacc agccggtggt aaagcagatg gatctgtaga ttttggagaa ggtgcagaat
3600

tttgtactag agatgatact cctatgatgg caagacctga tagtggtgaa gcatgtgatc
3660

aaaatagagc tggaactagt gaacaacagg gtgatcttag taaaagaact aaaaaataag
3720

ctagc
3725

<210> 6
<211> 1232
<212> PRT
<213> Desulfovibrio africanus

<400> 6

Met	Gly	Lys	Lys	Met	Met	Thr	Thr	Asp	Gly	Asn	Thr	Ala	Thr	Ala	His
1				5					10					15	

Val	Ala	Tyr	Ala	Met	Ser	Glu	Val	Ala	Ala	Ile	Tyr	Pro	Ile	Thr	Pro
			20					25					30		

035950

Ser Ser Thr Met Gly Glu Glu Ala Asp Asp Trp Ala Ala Gln Gly Arg
35 40 45

Lys Asn Ile Phe Gly Gln Thr Leu Thr Ile Arg Glu Met Gln Ser Glu
50 55 60

Ala Gly Ala Ala Gly Ala Val His Gly Ala Leu Ala Ala Gly Ala Leu
65 70 75 80

Thr Thr Thr Phe Thr Ala Ser Gln Gly Leu Leu Leu Met Ile Pro Asn
85 90 95

Met Tyr Lys Ile Ser Gly Glu Leu Leu Pro Gly Val Phe His Val Thr
100 105 110

Ala Arg Ala Ile Ala Ala His Ala Leu Ser Ile Phe Gly Asp His Gln
115 120 125

Asp Ile Tyr Ala Ala Arg Gln Thr Gly Phe Ala Met Leu Ala Ser Ser
130 135 140

Ser Val Gln Glu Ala His Asp Met Ala Leu Val Ala His Leu Ala Ala
145 150 155 160

Ile Glu Ser Asn Val Pro Phe Met His Phe Phe Asp Gly Phe Arg Thr
165 170 175

Ser His Glu Ile Gln Lys Ile Glu Val Leu Asp Tyr Ala Asp Met Ala
180 185 190

Ser Leu Val Asn Gln Lys Ala Leu Ala Glu Phe Arg Ala Lys Ser Met
195 200 205

Asn Pro Glu His Pro His Val Arg Gly Thr Ala Gln Asn Pro Asp Ile
210 215 220

Tyr Phe Gln Gly Arg Glu Ala Ala Asn Pro Tyr Tyr Leu Lys Val Pro
225 230 235 240

Gly Ile Val Ala Glu Tyr Met Gln Lys Val Ala Ser Leu Thr Gly Arg
245 250 255

Ser Tyr Lys Leu Phe Asp Tyr Val Gly Ala Pro Asp Ala Glu Arg Val
260 265 270

Ile Val Ser Met Gly Ser Ser Cys Glu Thr Ile Glu Glu Val Ile Asn

035950

275	280	285
His Leu Ala Ala Lys Gly Glu Lys Ile Gly Leu Ile Lys Val Arg Leu		
290	295	300
Tyr Arg Pro Phe Val Ser Glu Ala Phe Phe Ala Ala Leu Pro Ala Ser		
305	310	315
Ala Lys Val Ile Thr Val Leu Asp Arg Thr Lys Glu Pro Gly Ala Pro		
	325	330
Gly Asp Pro Leu Tyr Leu Asp Val Cys Ser Ala Phe Val Glu Arg Gly		
	340	345
Glu Ala Met Pro Lys Ile Leu Ala Gly Arg Tyr Gly Leu Gly Ser Lys		
	355	360
Glu Phe Ser Pro Ala Met Val Lys Ser Val Tyr Asp Asn Met Ser Gly		
	370	375
Ala Lys Lys Asn His Phe Thr Val Gly Ile Glu Asp Asp Val Thr Gly		
385	390	395
Thr Ser Leu Pro Val Asp Asn Ala Phe Ala Asp Thr Thr Pro Lys Gly		
	405	410
Thr Ile Gln Cys Gln Phe Trp Gly Leu Gly Ala Asp Gly Thr Val Gly		
	420	425
Ala Asn Lys Gln Ala Ile Lys Ile Ile Gly Asp Asn Thr Asp Leu Phe		
	435	440
Ala Gln Gly Tyr Phe Ser Tyr Asp Ser Lys Lys Ser Gly Gly Ile Thr		
	450	455
Ile Ser His Leu Arg Phe Gly Glu Lys Pro Ile Gln Ser Thr Tyr Leu		
465	470	475
Val Asn Arg Ala Asp Tyr Val Ala Cys His Asn Pro Ala Tyr Val Gly		
	485	490
Ile Tyr Asp Ile Leu Glu Gly Ile Lys Asp Gly Gly Thr Phe Val Leu		
	500	505
Asn Ser Pro Trp Ser Ser Leu Glu Asp Met Asp Lys His Leu Pro Ser		
	515	520
		525

035950

Gly	Ile	Lys	Arg	Thr	Ile	Ala	Asn	Lys	Lys	Leu	Lys	Phe	Tyr	Asn	Ile		
530						535					540						
Asp	Ala	Val	Lys	Ile	Ala	Thr	Asp	Val	Gly	Leu	Gly	Gly	Arg	Ile	Asn		
545					550					555					560		
Met	Ile	Met	Gln	Thr	Ala	Phe	Phe	Lys	Leu	Ala	Gly	Val	Leu	Pro	Phe		
				565					570					575			
Glu	Lys	Ala	Val	Asp	Leu	Leu	Lys	Lys	Ser	Ile	His	Lys	Ala	Tyr	Gly		
			580					585					590				
Lys	Lys	Gly	Glu	Lys	Ile	Val	Lys	Met	Asn	Thr	Asp	Ala	Val	Asp	Gln		
		595					600					605					
Ala	Val	Thr	Ser	Leu	Gln	Glu	Phe	Lys	Tyr	Pro	Asp	Ser	Trp	Lys	Asp		
	610					615					620						
Ala	Pro	Ala	Glu	Thr	Lys	Ala	Glu	Pro	Met	Thr	Asn	Glu	Phe	Phe	Lys		
625					630					635					640		
Asn	Val	Val	Lys	Pro	Ile	Leu	Thr	Gln	Gln	Gly	Asp	Lys	Leu	Pro	Val		
				645					650					655			
Ser	Ala	Phe	Glu	Ala	Asp	Gly	Arg	Phe	Pro	Leu	Gly	Thr	Ser	Gln	Phe		
		660						665					670				
Glu	Lys	Arg	Gly	Val	Ala	Ile	Asn	Val	Pro	Gln	Trp	Val	Pro	Glu	Asn		
		675					680					685					
Cys	Ile	Gln	Cys	Asn	Gln	Cys	Ala	Phe	Val	Cys	Pro	His	Ser	Ala	Ile		
	690					695				700							
Leu	Pro	Val	Leu	Ala	Lys	Glu	Glu	Glu	Leu	Val	Gly	Ala	Pro	Ala	Asn		
705					710					715					720		
Phe	Thr	Ala	Leu	Glu	Ala	Lys	Gly	Lys	Glu	Leu	Lys	Gly	Tyr	Lys	Phe		
				725					730					735			
Arg	Ile	Gln	Ile	Asn	Thr	Leu	Asp	Cys	Met	Gly	Cys	Gly	Asn	Cys	Ala		
		740						745					750				
Asp	Ile	Cys	Pro	Pro	Lys	Glu	Lys	Ala	Leu	Val	Met	Gln	Pro	Leu	Asp		
		755					760					765					

035950

Thr	Gln	Arg	Asp	Ala	Gln	Val	Pro	Asn	Leu	Glu	Tyr	Ala	Ala	Arg	Ile	770	775	780	
Pro	Val	Lys	Ser	Glu	Val	Leu	Pro	Arg	Asp	Ser	Leu	Lys	Gly	Ser	Gln	785	790	795	800
Phe	Gln	Glu	Pro	Leu	Met	Glu	Phe	Ser	Gly	Ala	Cys	Ser	Gly	Cys	Gly	805	810	815	
Glu	Thr	Pro	Tyr	Val	Arg	Val	Ile	Thr	Gln	Leu	Phe	Gly	Glu	Arg	Met	820	825	830	
Phe	Ile	Ala	Asn	Ala	Thr	Gly	Cys	Ser	Ser	Ile	Trp	Gly	Ala	Ser	Ala	835	840	845	
Pro	Ser	Met	Pro	Tyr	Lys	Thr	Asn	Arg	Leu	Gly	Gln	Gly	Pro	Ala	Trp	850	855	860	
Gly	Asn	Ser	Leu	Phe	Glu	Asp	Ala	Ala	Glu	Tyr	Gly	Phe	Gly	Met	Asn	865	870	875	880
Met	Ser	Met	Phe	Ala	Arg	Arg	Thr	His	Leu	Ala	Asp	Leu	Ala	Ala	Lys	885	890	895	
Ala	Leu	Glu	Ser	Asp	Ala	Ser	Gly	Asp	Val	Lys	Glu	Ala	Leu	Gln	Gly	900	905	910	
Trp	Leu	Ala	Gly	Lys	Asn	Asp	Pro	Ile	Lys	Ser	Lys	Glu	Tyr	Gly	Asp	915	920	925	
Lys	Leu	Lys	Lys	Leu	Leu	Ala	Gly	Gln	Lys	Asp	Gly	Leu	Leu	Gly	Gln	930	935	940	
Ile	Ala	Ala	Met	Ser	Asp	Leu	Tyr	Thr	Lys	Lys	Ser	Val	Trp	Ile	Phe	945	950	955	960
Gly	Gly	Asp	Gly	Trp	Ala	Tyr	Asp	Ile	Gly	Tyr	Gly	Gly	Leu	Asp	His	965	970	975	
Val	Leu	Ala	Ser	Gly	Glu	Asp	Val	Asn	Val	Phe	Val	Met	Asp	Thr	Glu	980	985	990	
Val	Tyr	Ser	Asn	Thr	Gly	Gly	Gln	Ser	Ser	Lys	Ala	Thr	Pro	Thr	Gly	995	1000	1005	

035950

Ala Val	Ala Lys Phe	Ala Ala	Ala Gly Lys Arg	Thr Gly Lys Lys
1010		1015		1020
Asp Leu	Ala Arg Met Val	Met Thr Tyr Gly Tyr	Val Tyr Val Ala	
1025		1030	1035	
Thr Val	Ser Met Gly Tyr	Ser Lys Gln Gln Phe	Leu Lys Val Leu	
1040		1045	1050	
Lys Glu	Ala Glu Ser Phe	Pro Gly Pro Ser Leu	Val Ile Ala Tyr	
1055		1060	1065	
Ala Thr	Cys Ile Asn Gln	Gly Leu Arg Lys Gly	Met Gly Lys Ser	
1070		1075	1080	
Gln Asp	Val Met Asn Thr	Ala Val Lys Ser Gly	Tyr Trp Pro Leu	
1085		1090	1095	
Phe Arg	Tyr Asp Pro Arg	Leu Ala Ala Gln Gly	Lys Asn Pro Phe	
1100		1105	1110	
Gln Leu	Asp Ser Lys Ala	Pro Asp Gly Ser Val	Glu Glu Phe Leu	
1115		1120	1125	
Met Ala	Gln Asn Arg Phe	Ala Val Leu Asp Arg	Ser Phe Pro Glu	
1130		1135	1140	
Asp Ala	Lys Arg Leu Arg	Ala Gln Val Ala His	Glu Leu Asp Val	
1145		1150	1155	
Arg Phe	Lys Glu Leu Glu	His Met Ala Ala Thr	Asn Ile Phe Glu	
1160		1165	1170	
Ser Phe	Ala Pro Ala Gly	Gly Lys Ala Asp Gly	Ser Val Asp Phe	
1175		1180	1185	
Gly Glu	Gly Ala Glu Phe	Cys Thr Arg Asp Asp	Thr Pro Met Met	
1190		1195	1200	
Ala Arg	Pro Asp Ser Gly	Glu Ala Cys Asp Gln	Asn Arg Ala Gly	
1205		1210	1215	
Thr Ser	Glu Gln Gln Gly	Asp Leu Ser Lys Arg	Thr Lys Lys	
1220		1225	1230	

<210> 7

<211> 1617

<212> DNA

<213> Clostridium autoethanogenum LZ1561

<400> 7

atggttatga aagctgctga agcagttatc caatgtttta aaaaagaaaa tgtaaatatg
60

gtatttgggt atcctgggtg tgcagtgggt cctatatatg aagctttgag aaaatcagat
120

gtgaagcata tattagtaag acaggaacaa gctgcaggac actctgctag tggatatgct
180

agggtcaactg gagaagttgg agtctgtata gttacatcag gacctggcgc aactaatcta
240

attactgcc a ttgctgctgc atatatggat tccattcctc ttgttggtat tacgggtcag
300

gttaagtcta cattaatcgg aagggatgta ttccaagaat tagatatcac aggtgctaca
360

gaatctttta caaaatataa ttttcttgta agagatgcta aatctatacc taagactata
420

aaggaagcat tttatatagc tgaaactggg agaaaaggcc ctgtgcttgt agatatacct
480

atggatataa tggaagaaga tattgatttt gaatatcctg aaagtgtaaa tataagagga
540

tacaaaccta ctgttaaagg acactctggg caaataaaga aaataataga tagaatcaaa
600

gtagcaaga gacctcttat ttgtgcaggg gccggagtta tactggcaaa tgcacaaaaa
660

gaactggagc aatttggtta aaaaatcacat atacctgttg ttcatactct tatgggaaaa
720

ggatgtataa atgaaaatag tgattattat gtaggtttta taggtactca tggctttgct
780

tatgccata aagttgtaca aaatgcagat gtactaatac ttattggagc tagagcttca
840

gatagaactg tcagtggagt aaaaagtttt gcaaaggatg cagatataat tcatatagat
900

atcgatcctg ctgaaatagg taaaattctg aacacttata ttccagtggg tgggtgattgt
960

ggaagtgttt tatcggattt aaataaagaa atagtagctc cacagacaga aaaatggatg
1020

gaagaaatta aaaattggaa aaaagatttg tatatagaaa gaaagcctac agataaagtt
1080

aatcccaa atgtgttaaa aactgtttct gatacattag gagaagaggt tattttgaca
1140

gcagatgtag gacaaaatca gttgtggtgt gcccgtaatt ttaggatgac agggaataga
1200

aagtttttaa cttctggagg cctcgggaact atgggatatt ctctcccagc agctattggt
1260

gctaaaattg catgtcctga taagcaagtt atagcttttg caggtgatgg tggatttcaa
1320

atgagtcctt ttgaacttgg aactattgcc gaaaataatc taaacattat tatagttttg
1380

tttaacaact caggactggg tatggttagg gagatacaag acaataaata ttctggtgaa
1440

tttggagtaa attttaggac caatccagat tttgtaaaac ttgcagaagc ctatggatta
1500

aaagctaaga gagtagaaaa tgattctgaa tttaacggag tttttagaga agcattagat
1560

tcaagcaagg catttttaat agagtgcatt gtagatcctc atgagagaac ttttttag
1617

<210> 8

<211> 538

<212> PRT

<213> Clostridium autoethanogenum LZ1561

<400> 8

Met	Val	Met	Lys	Ala	Ala	Glu	Ala	Val	Ile	Gln	Cys	Leu	Lys	Lys	Glu
1			5					10					15		

Asn	Val	Asn	Met	Val	Phe	Gly	Tyr	Pro	Gly	Ala	Ala	Val	Val	Pro	Ile
		20					25					30			

Tyr	Glu	Ala	Leu	Arg	Lys	Ser	Asp	Val	Lys	His	Ile	Leu	Val	Arg	Gln
	35					40					45				

Glu	Gln	Ala	Ala	Gly	His	Ser	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ala	Arg	Ser	Thr	Gly
	50				55					60					

Glu	Val	Gly	Val	Cys	Ile	Val	Thr	Ser	Gly	Pro	Gly	Ala	Thr	Asn	Leu
65				70					75					80	

Ile	Thr	Ala	Ile	Ala	Ala	Ala	Tyr	Met	Asp	Ser	Ile	Pro	Leu	Val	Val
		85					90						95		

Ile	Thr	Gly	Gln	Val	Lys	Ser	Thr	Leu	Ile	Gly	Arg	Asp	Val	Phe	Gln
		100					105					110			

035950

Glu Leu Asp Ile Thr Gly Ala Thr Glu Ser Phe Thr Lys Tyr Asn Phe
115 120 125

Leu Val Arg Asp Ala Lys Ser Ile Pro Lys Thr Ile Lys Glu Ala Phe
130 135 140

Tyr Ile Ala Glu Thr Gly Arg Lys Gly Pro Val Leu Val Asp Ile Pro
145 150 155 160

Met Asp Ile Met Glu Glu Asp Ile Asp Phe Glu Tyr Pro Glu Ser Val
165 170 175

Asn Ile Arg Gly Tyr Lys Pro Thr Val Lys Gly His Ser Gly Gln Ile
180 185 190

Lys Lys Ile Ile Asp Arg Ile Lys Val Ser Lys Arg Pro Leu Ile Cys
195 200 205

Ala Gly Gly Gly Val Ile Leu Ala Asn Ala Gln Lys Glu Leu Glu Gln
210 215 220

Phe Val Lys Lys Ser His Ile Pro Val Val His Thr Leu Met Gly Lys
225 230 235 240

Gly Cys Ile Asn Glu Asn Ser Asp Tyr Tyr Val Gly Leu Ile Gly Thr
245 250 255

His Gly Phe Ala Tyr Ala Asn Lys Val Val Gln Asn Ala Asp Val Leu
260 265 270

Ile Leu Ile Gly Ala Arg Ala Ser Asp Arg Thr Val Ser Gly Val Lys
275 280 285

Ser Phe Ala Lys Asp Ala Asp Ile Ile His Ile Asp Ile Asp Pro Ala
290 295 300

Glu Ile Gly Lys Ile Leu Asn Thr Tyr Ile Pro Val Val Gly Asp Cys
305 310 315 320

Gly Ser Val Leu Ser Asp Leu Asn Lys Glu Ile Val Ala Pro Gln Thr
325 330 335

Glu Lys Trp Met Glu Glu Ile Lys Asn Trp Lys Lys Asp Leu Tyr Ile
340 345 350

Glu Arg Lys Pro Thr Asp Lys Val Asn Pro Lys Tyr Val Leu Lys Thr

035950

355	360	365
Val Ser Asp Thr Leu Gly Glu Glu Val Ile Leu Thr Ala Asp Val Gly		
370	375	380
Gln Asn Gln Leu Trp Cys Ala Arg Asn Phe Arg Met Thr Gly Asn Arg		
385	390	395
Lys Phe Leu Thr Ser Gly Gly Leu Gly Thr Met Gly Tyr Ser Leu Pro		
	405	410
Ala Ala Ile Gly Ala Lys Ile Ala Cys Pro Asp Lys Gln Val Ile Ala		
	420	425
Phe Ala Gly Asp Gly Gly Phe Gln Met Ser Leu Phe Glu Leu Gly Thr		
	435	440
Ile Ala Glu Asn Asn Leu Asn Ile Ile Ile Val Leu Phe Asn Asn Ser		
	450	455
Gly Leu Gly Met Val Arg Glu Ile Gln Asp Asn Lys Tyr Ser Gly Glu		
465	470	475
Phe Gly Val Asn Phe Arg Thr Asn Pro Asp Phe Val Lys Leu Ala Glu		
	485	490
Ala Tyr Gly Leu Lys Ala Lys Arg Val Glu Asn Asp Ser Glu Phe Asn		
	500	505
Gly Val Phe Arg Glu Ala Leu Asp Ser Ser Lys Ala Phe Leu Ile Glu		
	515	520
Cys Ile Val Asp Pro His Glu Arg Thr Phe		
	530	535

<210> 9
 <211> 1677
 <212> DNA
 <213> Clostridium autoethanogenum LZ1561

<400> 9
 atgaaaataa agggagctga agtactatta aaatgtatga tggagcaagg thtagatact
 60

gtattcggat atccgggagg agctgtttta cctatttatg atgcactata tgctgctaag
 120

ggaaagataa ctcacatatc gacttcacat gaacaagggg ctgctcatgc tgcagatgga
 180

tatgcaagat ctacaggaaa ggtaggagtt gtaattgcaa catcagggcc gggagctact
240

aatacgggta cagcaattgc tacagcttat atggattccg tacctattgt agtatTTTaca
300

ggacagggtg cgagaagtct tcttggaag gattcttttc aagaagtaaa tattaagat
360

attactgcat ccataactaa gaaaagttgc attgtagaaa aggtagagga tttagctgat
420

actgtaagag aggcatttca aattgcagtt agtgggaagac caggacctgt agtagtagat
480

atacctaaaag acgtacaatc agctgaagta gaatatgagc cttttagaag taagctttct
540

gaaattaaaag aaaagaaata ttttaattta aatgagtatg gagacagttt aaataaggca
600

atagatatga taaataggag tgagagacct gtaatttatt cagggtggagg aactgtcaca
660

tcaggagctc aaaatgaatt gatggaaactt gtagaaaaaa tagattcacc aattacctgt
720

tcacttatgg gaataggagc tttcccgga aacaatgaat attatatggg tatggttgga
780

atgcatggaa gccgttgctc aaattatgca gtaagtaatt gtgacttatt aatagctata
840

ggagctaggt ttagtgatag ggttataagc aaggtaagt cctttgctcc aaaagcaaga
900

ataatacaca tagacattga ccctaaggag tttggcaaaa acgtggatat agatgtagca
960

ataaaaggag atgtaaaaga ggtacttcaa aagattaatt gcaagttaga aaaggccgac
1020

cacagggatt ggatggagaa aataaaacag tggaaaagt aacagtgtga accttttaaa
1080

gaatgtaa at taagtcctaa gtttataatg gataccttgt ataactttac aggaggagaa
1140

tgcataatta ctacagaagt tggccaaaat caaatttgga ctgcacaata ttttaaattc
1200

ttaaagccaa gaacatttgt atcttcaggc ggacttggaa ctatgggctt cggacttggga
1260

gcttctatag gagcatctat gggtaatcca gggaaaaagg taataaatgt agcaggggat
1320

gggagcttta aaatgaattc tacagagctt gctactgttg ccaaataataa gctccctatt
1380

gtacaattgc ttttaaataa tcgtgcatta ggcattggat atcaatggca ggatatgttc
1440

tatggaaaga ggttttcaaa tacagaactt ggaccagatg ttgatttcat gaaacttgga
1500

gaagcgtatg gtataaagac ttttaagata gaagacaata gccaggtaga gaaatgctta
1560

aaggaagctc ttgacttaaa tgaacctgta attatagaat gtgatataga taggaaagaa
1620

aagggtatttc ctattgtacc tccgggagcg gctatatcag atttagtaga agagtaa
1677

<210> 10

<211> 558

<212> PRT

<213> Clostridium autoethanogenum LZ1561

<400> 10

Met Lys Ile Lys Gly Ala Glu Val Leu Leu Lys Cys Met Met Glu Gln
1 5 10 15

Gly Val Asp Thr Val Phe Gly Tyr Pro Gly Gly Ala Val Leu Pro Ile
20 25 30

Tyr Asp Ala Leu Tyr Ala Ala Lys Gly Lys Ile Thr His Ile Ser Thr
35 40 45

Ser His Glu Gln Gly Ala Ala His Ala Ala Asp Gly Tyr Ala Arg Ser
50 55 60

Thr Gly Lys Val Gly Val Val Ile Ala Thr Ser Gly Pro Gly Ala Thr
65 70 75 80

Asn Thr Val Thr Ala Ile Ala Thr Ala Tyr Met Asp Ser Val Pro Ile
85 90 95

Val Val Phe Thr Gly Gln Val Ala Arg Ser Leu Leu Gly Lys Asp Ser
100 105 110

Phe Gln Glu Val Asn Ile Lys Asp Ile Thr Ala Ser Ile Thr Lys Lys
115 120 125

Ser Cys Ile Val Glu Lys Val Glu Asp Leu Ala Asp Thr Val Arg Glu
130 135 140

Ala Phe Gln Ile Ala Val Ser Gly Arg Pro Gly Pro Val Val Val Asp
145 150 155 160

035950

Ile Pro Lys Asp Val Gln Ser Ala Glu Val Glu Tyr Glu Pro Phe Arg
165 170 175

Ser Lys Leu Ser Glu Ile Lys Glu Lys Lys Tyr Phe Asn Leu Asn Glu
180 185 190

Tyr Gly Asp Ser Leu Asn Lys Ala Ile Asp Met Ile Asn Arg Ser Glu
195 200 205

Arg Pro Val Ile Tyr Ser Gly Gly Gly Thr Val Thr Ser Gly Ala Gln
210 215 220

Asn Glu Leu Met Glu Leu Val Glu Lys Ile Asp Ser Pro Ile Thr Cys
225 230 235 240

Ser Leu Met Gly Ile Gly Ala Phe Pro Gly Asn Asn Glu Tyr Tyr Met
245 250 255

Gly Met Val Gly Met His Gly Ser Arg Cys Ser Asn Tyr Ala Val Ser
260 265 270

Asn Cys Asp Leu Leu Ile Ala Ile Gly Ala Arg Phe Ser Asp Arg Val
275 280 285

Ile Ser Lys Val Ser Ala Phe Ala Pro Lys Ala Arg Ile Ile His Ile
290 295 300

Asp Ile Asp Pro Lys Glu Phe Gly Lys Asn Val Asp Ile Asp Val Ala
305 310 315 320

Ile Lys Gly Asp Val Lys Glu Val Leu Gln Lys Ile Asn Cys Lys Leu
325 330 335

Glu Lys Ala Asp His Arg Asp Trp Met Glu Lys Ile Lys Gln Trp Lys
340 345 350

Ser Glu Gln Cys Glu Pro Phe Lys Glu Cys Lys Leu Ser Pro Lys Phe
355 360 365

Ile Met Asp Thr Leu Tyr Asn Leu Thr Gly Gly Glu Cys Ile Ile Thr
370 375 380

Thr Glu Val Gly Gln Asn Gln Ile Trp Thr Ala Gln Tyr Phe Lys Phe
385 390 395 400

035950

Leu Lys Pro Arg Thr Phe Val Ser Ser Gly Gly Leu Gly Thr Met Gly
405 410 415

Phe Gly Leu Gly Ala Ser Ile Gly Ala Ser Met Gly Asn Pro Gly Lys
420 425 430

Lys Val Ile Asn Val Ala Gly Asp Gly Ser Phe Lys Met Asn Ser Thr
435 440 445

Glu Leu Ala Thr Val Ala Lys Tyr Lys Leu Pro Ile Val Gln Leu Leu
450 455 460

Leu Asn Asn Arg Ala Leu Gly Met Val Tyr Gln Trp Gln Asp Met Phe
465 470 475 480

Tyr Gly Lys Arg Phe Ser Asn Thr Glu Leu Gly Pro Asp Val Asp Phe
485 490 495

Met Lys Leu Gly Glu Ala Tyr Gly Ile Lys Thr Phe Lys Ile Glu Asp
500 505 510

Asn Ser Gln Val Glu Lys Cys Leu Lys Glu Ala Leu Asp Leu Asn Glu
515 520 525

Pro Val Ile Ile Glu Cys Asp Ile Asp Arg Lys Glu Lys Val Phe Pro
530 535 540

Ile Val Pro Pro Gly Ala Ala Ile Ser Asp Leu Val Glu Glu
545 550 555

<210> 11
<211> 486
<212> DNA
<213> Clostridium autoethanogenum LZ1561

<400> 11
catatgagtg tacttgtaga aaatcatagt ggtgtattaa gtaaagtagc aggattattt
60

agtagaagag gatataacat tcatagttta actgttggag taactgggtga tcctgaaata
120

agtagaatga ctatagtaag tattggagat gattatatgt ttgaacaaat atctaaacag
180

cttaataaat tgatagaagt aataaaagta atagaattaa atcctgatgc aagtgtatat
240

agagaattaa gtcttataaa agtaagtgca gaaagtaata acaaacttct tataatggaa
300

035950

agtgtaaata ctttttagagg taaaatagta gatatgaatg aaaaaagtat gataatagaa
360

ataactggaa atgaaaaaaaa aataagtgc tttatagaat taatgaaacc ttatggaata
420

aaagaaataa taagaactgg attaactgca ttacaaagag gatcaaaatt agaagattaa
480

gagctc
486

<210> 12
<211> 158
<212> PRT
<213> Clostridium autoethanogenum LZ1561

<400> 12

Met	Ser	Val	Leu	Val	Glu	Asn	His	Ser	Gly	Val	Leu	Ser	Lys	Val	Ala
1				5					10					15	

Gly	Leu	Phe	Ser	Arg	Arg	Gly	Tyr	Asn	Ile	His	Ser	Leu	Thr	Val	Gly
			20					25					30		

Val	Thr	Gly	Asp	Pro	Glu	Ile	Ser	Arg	Met	Thr	Ile	Val	Ser	Ile	Gly
		35					40					45			

Asp	Asp	Tyr	Met	Phe	Glu	Gln	Ile	Ser	Lys	Gln	Leu	Asn	Lys	Leu	Ile
	50					55					60				

Glu	Val	Ile	Lys	Val	Ile	Glu	Leu	Asn	Pro	Asp	Ala	Ser	Val	Tyr	Arg
65					70					75					80

Glu	Leu	Ser	Leu	Ile	Lys	Val	Ser	Ala	Glu	Ser	Asn	Asn	Lys	Leu	Leu
			85						90					95	

Ile	Met	Glu	Ser	Val	Asn	Thr	Phe	Arg	Gly	Lys	Ile	Val	Asp	Met	Asn
			100					105					110		

Glu	Lys	Ser	Met	Ile	Ile	Glu	Ile	Thr	Gly	Asn	Glu	Lys	Lys	Ile	Ser
		115					120					125			

Ala	Phe	Ile	Glu	Leu	Met	Lys	Pro	Tyr	Gly	Ile	Lys	Glu	Ile	Ile	Arg
	130					135					140				

Thr	Gly	Leu	Thr	Ala	Leu	Gln	Arg	Gly	Ser	Lys	Leu	Glu	Asp
145					150					155			

<210> 13
 <211> 486
 <212> DNA
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Мутантная IlvN (G-10-D) ацетолактатсинтаза,
 Clostridium autoethanogenum LZ1561

<400> 13

catatgagtg tacttgtaga aaatcatagt gatgtattaa gtaaagtagc aggattatTT
 60

agtagaagag gatataacat tcatagttta actggtggag taactgggta tcctgaaata
 120

agtagaatga ctatagtaag tattggagat gattatatgt ttgaacaaat atctaaacag
 180

cttaataaat tgatagaagt aataaaagta atagaattaa atcctgatgc aagtgtatat
 240

agagaattaa gtcttataaa agtaagtgc gaaagtaata acaaacttct tataatggaa
 300

agtgtaaata ctttttagagg taaaatagta gatatgaatg aaaaaagtat gataatagaa
 360

ataactggaa atgaaaaaaaa aataagtgc tttatagaat taatgaaacc ttatggaata
 420

aaagaaataa taagaactgg attaactgca ttacaaagag gatcaaaatt agaagattaa
 480

gagctc
 486

<210> 14
 <211> 158
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Мутантная IlvN (G-10-D) ацетолактатсинтаза,
 Clostridium autoethanogenum LZ1561

<400> 14

Met	Ser	Val	Leu	Val	Glu	Asn	His	Ser	Asp	Val	Leu	Ser	Lys	Val	Ala
1				5					10					15	

Gly	Leu	Phe	Ser	Arg	Arg	Gly	Tyr	Asn	Ile	His	Ser	Leu	Thr	Val	Gly
			20					25					30		

Val	Thr	Gly	Asp	Pro	Glu	Ile	Ser	Arg	Met	Thr	Ile	Val	Ser	Ile	Gly
		35						40				45			

035950

Asp Asp Tyr Met Phe Glu Gln Ile Ser Lys Gln Leu Asn Lys Leu Ile
50 55 60

Glu Val Ile Lys Val Ile Glu Leu Asn Pro Asp Ala Ser Val Tyr Arg
65 70 75 80

Glu Leu Ser Leu Ile Lys Val Ser Ala Glu Ser Asn Asn Lys Leu Leu
85 90 95

Ile Met Glu Ser Val Asn Thr Phe Arg Gly Lys Ile Val Asp Met Asn
100 105 110

Glu Lys Ser Met Ile Ile Glu Ile Thr Gly Asn Glu Lys Lys Ile Ser
115 120 125

Ala Phe Ile Glu Leu Met Lys Pro Tyr Gly Ile Lys Glu Ile Ile Arg
130 135 140

Thr Gly Leu Thr Ala Leu Gln Arg Gly Ser Lys Leu Glu Asp
145 150 155

<210> 15

<211> 1671

<212> DNA

<213> Clostridium autoethanogenum LZ1561

<400> 15

atgaatagag atataaaaaa agaagtccaa ctaaatacag ctcaaagtgt agtaaaatgt
60

ttagaagccg aaggagtaaa gtacatcttt ggtattcctg gtgaagaaaa cctagaaata
120

atgaatgcaa tttcagattc aactattgaa tttatcacaa cccgtcatga gcaaggtgct
180

gcatttatgg ccgacgttta tggacgttta acaggaaaag caggtgtttg cctatcaaca
240

ctaggaccag gtgccactaa cttagtaact ggtgtagcag atgctgatag tgatgggtgct
300

ccggttggtg ctattacagg tcaagtaggt actgaaagaa tgcataaac atcgcaccaa
360

tttttagacc ttgcaaaat gttcgaacca atcacaaaga gaagtaaaca aatcgttcgt
420

cctgatactg taagtgagat tataagactt gtttttaagt atgctgaaag tgaaaagcct
480

ggagcatgcc acattgattt acctgtaaat attgcaaaaa tgcccgtagg tgcttttagaa
540

aagccttttg aaaagaagat tccaccaaag gaacatgcag atttatcaac aattgaggaa
600

gctgcaagt aaatcttcaa agcaaaaaat cctattatct tagctggaag cggtgctata
660

agaggaaatt cttcaaaagc tgttacggaa tttgcaacta aattgaaaat tccagtaatt
720

aatacgatga tggcaaaagg tattattcca atggataaca agtattcaat gtggacaata
780

ggtattccac aaaaagatta tgtaataaaa attattgaag aggctgattt agtaattaca
840

attggatatg atattgtaga atatgcccc tccaaatgga atataaatgg ggacattaaa
900

attgtgcata tcgatgcaag accatcacac atcaataaac tttatcagcc catagtagaa
960

gtagtgttg atatttcaga tgctctatac aatatattga gaagaacttc tagcaaagat
1020

gaaccagtaa aagctttgga aattaaatca gaaatgctag ctgaacatga aagctatgca
1080

aatgacaatg cttttccaat gaaaccccaa agaattttta atgatgttag aaaggtcatg
1140

ggaccacatg acattgtcat atcagatgta ggtgcccata aaatgtggat tgccagacat
1200

tataactgct atgagcccaa tacatgtatt atttcaaacg gttttgctac aatgggtatt
1260

ggtgttccag gtgcaattgc agccaaatta attaatccag ataaaaaagt attggctatt
1320

gttggtgatg gcggtttcat gatgaataat caagaattag aaacagccct acgtattaaa
1380

actccaattg tagttttaat atttaatgac agtaactacg gtttaataaa gtggaaacaa
1440

gaagaacact atggtaaaag ctgttatgta gattttacta atccagactt tgtaaagctt
1500

gcagaaaagta tgtatgcaaa aggatatcga gtagaaaaag cagaagattt aattccaact
1560

ttagaagaag ctttcaaaca aaatgtacct gcagttattg attgtcaagt tgactatggt
1620

gaaaatataa agcttacaaa gcatttaaaa gaagtttatg aaaatatgta a
1671

<210> 16
<211> 556
<212> PRT

035950

<213> Clostridium autoethanogenum LZ1561

<400> 16

Met Asn Arg Asp Ile Lys Lys Glu Val Gln Leu Asn Thr Ala Gln Met
1 5 10 15

Leu Val Lys Cys Leu Glu Ala Glu Gly Val Lys Tyr Ile Phe Gly Ile
20 25 30

Pro Gly Glu Glu Asn Leu Glu Ile Met Asn Ala Ile Ser Asp Ser Thr
35 40 45

Ile Glu Phe Ile Thr Thr Arg His Glu Gln Gly Ala Ala Phe Met Ala
50 55 60

Asp Val Tyr Gly Arg Leu Thr Gly Lys Ala Gly Val Cys Leu Ser Thr
65 70 75 80

Leu Gly Pro Gly Ala Thr Asn Leu Val Thr Gly Val Ala Asp Ala Asp
85 90 95

Ser Asp Gly Ala Pro Val Val Ala Ile Thr Gly Gln Val Gly Thr Glu
100 105 110

Arg Met His Ile Thr Ser His Gln Phe Leu Asp Leu Cys Lys Met Phe
115 120 125

Glu Pro Ile Thr Lys Arg Ser Lys Gln Ile Val Arg Pro Asp Thr Val
130 135 140

Ser Glu Ile Ile Arg Leu Val Phe Lys Tyr Ala Glu Ser Glu Lys Pro
145 150 155 160

Gly Ala Cys His Ile Asp Leu Pro Val Asn Ile Ala Lys Met Pro Val
165 170 175

Gly Ala Leu Glu Lys Pro Leu Glu Lys Lys Ile Pro Pro Lys Glu His
180 185 190

Ala Asp Leu Ser Thr Ile Glu Glu Ala Ala Ser Glu Ile Phe Lys Ala
195 200 205

Lys Asn Pro Ile Ile Leu Ala Gly Ser Gly Ala Ile Arg Gly Asn Ser
210 215 220

Ser Lys Ala Val Thr Glu Phe Ala Thr Lys Leu Lys Ile Pro Val Ile

035950

225		230		235		240
Asn Thr Met Met	Ala Lys Gly Ile Ile	Pro Met Asp Asn Lys Tyr Ser				
	245	250			255	
Met Trp Thr Ile Gly Ile	Pro Gln Lys Asp Tyr Val	Asn Lys Ile Ile				
	260	265			270	
Glu Glu Ala Asp Leu Val Ile	Thr Ile Gly Tyr Asp	Ile Val Glu Tyr				
	275	280			285	
Ala Pro Ser Lys Trp Asn Ile	Asn Gly Asp Ile Lys Ile Val His Ile					
	290	295			300	
Asp Ala Arg Pro Ser His Ile	Asn Lys Leu Tyr Gln Pro Ile Val Glu					
305		310			315	320
Val Val Gly Asp Ile Ser Asp	Ala Leu Tyr Asn Ile Leu Arg Arg Thr					
	325				330	335
Ser Ser Lys Asp Glu Pro Val	Lys Ala Leu Glu Ile Lys Ser Glu Met					
	340				345	350
Leu Ala Glu His Glu Ser Tyr	Ala Asn Asp Asn Ala Phe Pro Met Lys					
	355				360	365
Pro Gln Arg Ile Leu Asn Asp	Val Arg Lys Val Met Gly Pro His Asp					
	370				375	380
Ile Val Ile Ser Asp Val Gly	Ala His Lys Met Trp Ile Ala Arg His					
385					390	395
Tyr Asn Cys Tyr Glu Pro Asn	Thr Cys Ile Ile Ser Asn Gly Phe Ala					
	405				410	415
Thr Met Gly Ile Gly Val Pro	Gly Ala Ile Ala Ala Lys Leu Ile Asn					
	420				425	430
Pro Asp Lys Lys Val Leu Ala	Ile Val Gly Asp Gly Gly Phe Met Met					
	435				440	445
Asn Asn Gln Glu Leu Glu Thr	Ala Leu Arg Ile Lys Thr Pro Ile Val					
	450				455	460
Val Leu Ile Phe Asn Asp Ser	Asn Tyr Gly Leu Ile Lys Trp Lys Gln					
465					470	475
						480

035950

Glu Glu His Tyr Gly Lys Ser Cys Tyr Val Asp Phe Thr Asn Pro Asp
 485 490 495

Phe Val Lys Leu Ala Glu Ser Met Tyr Ala Lys Gly Tyr Arg Val Glu
 500 505 510

Lys Ala Glu Asp Leu Ile Pro Thr Leu Glu Glu Ala Phe Lys Gln Asn
 515 520 525

Val Pro Ala Val Ile Asp Cys Gln Val Asp Tyr Gly Glu Asn Ile Lys
 530 535 540

Leu Thr Lys His Leu Lys Glu Val Tyr Glu Asn Met
 545 550 555

<210> 17

<211> 1680

<212> DNA

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Оптимизированная по кодону AlsS-ацетолактатсинтаза,
 Clostridium autoethanogenum LZ1561

<400> 17

catatgaata gagatataaa aaaagaagta caattaaata ctgcacaaat gttagtaaaa
 60

tgtttagaag cagaaggagt aaaatatata tttggaatac ctggagaaga aaatttagaa
 120

ataatgaatg caatatctga tagtactata gaatttataa ctactagaca tgaacaagga
 180

gcagcattta tggcagatgt atatggaaga ttaactggaa aagctggagt ttgtttaagt
 240

actttaggac ctggagcaac taatttagta actggagtag cagatgcaga tagtgatgga
 300

gcacctgtag tagcaataac tggacaagta ggaactgaaa gaatgcatat aactagtcac
 360

caatttttag atttatgtaa aatgtttgaa cctataacta aaagaagtaa acaaatagta
 420

agacctgata ctgtaagtga aataataaga ttagtattta aatatgcaga aagtgaaaaa
 480

cctggagcat gtcatataga tttacctgta aatatagcaa aatgcctgt tggagcatta
 540

gaaaaacctt tagaaaaaaa aatacctcct aaagaacatg cagatttaag tacaatagaa
 600

gaagcagcat ctgaaatatt taaagcaaaa aatcctataa tattagctgg aagtggagca
660

ataagaggaa atagtagtaa agcagtaact gaatttgcaa ctaaattaaa aatacctgta
720

ataaatacta tgatggcaaa aggaataata cctatggata ataaatatag tatgtggact
780

ataggaatac ctcaaaaaga ttatgtaaat aaaataatag aagaagctga tttagtaata
840

actataggat atgatatagt agaatatgca cctagtaa at ggaatataaa tggagatata
900

aaaatagtac atatagatgc aagacctagt catataaata aattatatca acctatagta
960

gaagtagttg gagatataag tgatgcatta tataatatat taagaagaac tagttcaaaa
1020

gatgaacctg taaaagcatt agaaataaaa agtgaaatgt tagcagaaca tgaaagttat
1080

gcaaatgata atgcatttcc tatgaaacct caaagaatat taaatgatgt aagaaaagta
1140

atgggacctc atgatatagt aataagtgat gttggagcac ataaaatgtg gatagcaaga
1200

cattataatt gttatgaacc taatacttgt ataataagta atggatttgc aacaatggga
1260

ataggagtac ctggagcaat agcagcaaaa ttaataaatc ctgataaaaa agtattagca
1320

atagttggag atggaggatt tatgatgaat aatcaagaat tagaaactgc attaagaata
1380

aaaactccta tagtagtatt aatattta at gatagtaatt atggattaat aaaatggaaa
1440

caagaagaac attatggaaa aagttgttat gtagatttta ctaatcctga ttttgtaaaa
1500

ttagcagaaa gtatgtatgc aaaaggatat agagtagaaa aagcagaaga ttaataacct
1560

actttagaag aagcatttaa acaaaatgta cctgcagtaa tagattgtca agtagattat
1620

ggagaaaata taaaattaac taaacattta aaagaagtat atgaaaatat gtaagagctc
1680

<210> 18

<211> 556

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Оптимизированная по кодону AlsS-ацетолактатсинтаза,
Clostridium autoethanogenum LZ1561

<400> 18

Met Asn Arg Asp Ile Lys Lys Glu Val Gln Leu Asn Thr Ala Gln Met
1 5 10 15

Leu Val Lys Cys Leu Glu Ala Glu Gly Val Lys Tyr Ile Phe Gly Ile
20 25 30

Pro Gly Glu Glu Asn Leu Glu Ile Met Asn Ala Ile Ser Asp Ser Thr
35 40 45

Ile Glu Phe Ile Thr Thr Arg His Glu Gln Gly Ala Ala Phe Met Ala
50 55 60

Asp Val Tyr Gly Arg Leu Thr Gly Lys Ala Gly Val Cys Leu Ser Thr
65 70 75 80

Leu Gly Pro Gly Ala Thr Asn Leu Val Thr Gly Val Ala Asp Ala Asp
85 90 95

Ser Asp Gly Ala Pro Val Val Ala Ile Thr Gly Gln Val Gly Thr Glu
100 105 110

Arg Met His Ile Thr Ser His Gln Phe Leu Asp Leu Cys Lys Met Phe
115 120 125

Glu Pro Ile Thr Lys Arg Ser Lys Gln Ile Val Arg Pro Asp Thr Val
130 135 140

Ser Glu Ile Ile Arg Leu Val Phe Lys Tyr Ala Glu Ser Glu Lys Pro
145 150 155 160

Gly Ala Cys His Ile Asp Leu Pro Val Asn Ile Ala Lys Met Pro Val
165 170 175

Gly Ala Leu Glu Lys Pro Leu Glu Lys Lys Ile Pro Pro Lys Glu His
180 185 190

Ala Asp Leu Ser Thr Ile Glu Glu Ala Ala Ser Glu Ile Phe Lys Ala
195 200 205

Lys Asn Pro Ile Ile Leu Ala Gly Ser Gly Ala Ile Arg Gly Asn Ser
210 215 220

035950

Ser Lys Ala Val Thr Glu Phe Ala Thr Lys Leu Lys Ile Pro Val Ile
 225 230 235 240

Asn Thr Met Met Ala Lys Gly Ile Ile Pro Met Asp Asn Lys Tyr Ser
 245 250 255

Met Trp Thr Ile Gly Ile Pro Gln Lys Asp Tyr Val Asn Lys Ile Ile
 260 265 270

Glu Glu Ala Asp Leu Val Ile Thr Ile Gly Tyr Asp Ile Val Glu Tyr
 275 280 285

Ala Pro Ser Lys Trp Asn Ile Asn Gly Asp Ile Lys Ile Val His Ile
 290 295 300

Asp Ala Arg Pro Ser His Ile Asn Lys Leu Tyr Gln Pro Ile Val Glu
 305 310 315 320

Val Val Gly Asp Ile Ser Asp Ala Leu Tyr Asn Ile Leu Arg Arg Thr
 325 330 335

Ser Ser Lys Asp Glu Pro Val Lys Ala Leu Glu Ile Lys Ser Glu Met
 340 345 350

Leu Ala Glu His Glu Ser Tyr Ala Asn Asp Asn Ala Phe Pro Met Lys
 355 360 365

Pro Gln Arg Ile Leu Asn Asp Val Arg Lys Val Met Gly Pro His Asp
 370 375 380

Ile Val Ile Ser Asp Val Gly Ala His Lys Met Trp Ile Ala Arg His
 385 390 395 400

Tyr Asn Cys Tyr Glu Pro Asn Thr Cys Ile Ile Ser Asn Gly Phe Ala
 405 410 415

Thr Met Gly Ile Gly Val Pro Gly Ala Ile Ala Ala Lys Leu Ile Asn
 420 425 430

Pro Asp Lys Lys Val Leu Ala Ile Val Gly Asp Gly Gly Phe Met Met
 435 440 445

Asn Asn Gln Glu Leu Glu Thr Ala Leu Arg Ile Lys Thr Pro Ile Val
 450 455 460

035950

Val Leu Ile Phe Asn Asp Ser Asn Tyr Gly Leu Ile Lys Trp Lys Gln
465 470 475 480

Glu Glu His Tyr Gly Lys Ser Cys Tyr Val Asp Phe Thr Asn Pro Asp
485 490 495

Phe Val Lys Leu Ala Glu Ser Met Tyr Ala Lys Gly Tyr Arg Val Glu
500 505 510

Lys Ala Glu Asp Leu Ile Pro Thr Leu Glu Glu Ala Phe Lys Gln Asn
515 520 525

Val Pro Ala Val Ile Asp Cys Gln Val Asp Tyr Gly Glu Asn Ile Lys
530 535 540

Leu Thr Lys His Leu Lys Glu Val Tyr Glu Asn Met
545 550 555

<210> 19
<211> 1722
<212> DNA
<213> Bacillus subtilis

<400> 19
catatgacta aagcaactaa agaacaaaaa agtttagtaa aaaatagagg tgcagaatta
60

gtagtagatt gtttagtaga acaagggtgta actcatgtat ttggaatacc tgggtgcaaaa
120

atagatgcag tatttgatgc attacaagat aaaggacctg aaataatagt agcaagacat
180

gaacaaaatg cagcatTTat ggcacaagca gtaggaagat taactggaaa acctgggtgta
240

gtacttgtaa ctagtggacc tgggtgcatca aatttagcaa ctggattatt aactgcaaT
300

actgaaggTg atcctgtagt agcatttagct ggaaatgtaa taagagcaga tagattaaaa
360

agaactcatc aaagtTtaga taatgcagca ttatttcaac ctataactaa atattctgta
420

gaagtacaag atgtaaaaaa tatacctgaa gcagtaacta atgcatttag aatagcaagt
480

gcaggacaag ctgggtgcagc ttttgtaagt tttcctcagg atgtagtaaa tgaagtaact
540

aatactaaaa atgtaagagc agtagcagca cctaaattag gacctgcagc agatgatgca
600

ataagtgcag caatagcaaa aatacaaaact gcaaaattac ctgtagtatt agtaggaatg
660

aaaggtggta gacctgaagc aataaaaagca gtaagaaaat tacttaaaaa agtacaatta
720

ccttttgtag aaacttatca agcagctgga actttaagta gagatttaga agatcaatat
780

tttgaagaa taggattatt tagaaatcaa cctggtgatt tattacttga acaagcagat
840

gtagtattaa ctataggata tgatccaata gaatatgac cttaaatttg gaatataaat
900

ggtgatagaa ctataatata tttagatgaa ataatagcag atatagatca tgcatatcaa
960

cctgatttag aattaattgg agatatacct agtactataa atcacataga acatgatgca
1020

gtaaaagtag aatttgcaga aagagaacaa aaaataactta gtgatttaaa acaatatatg
1080

catgaagggtg aacaagtacc tgcagattgg aaaagtgata gagcacatcc tttagaaata
1140

gtaaaagaat taagaaatgc agtagatgat catgtaactg taacttgtga tataggatct
1200

catgcaatat ggatgagtag atattttaga agttatgaac ctttaacttt aatgataagt
1260

aatggaatgc aaactcttgg agtagcatta ccttggggcaa ttggagcatc tttagtaaaa
1320

cctggtgaaa aagtagtaag tgtaagtggg gatggtggat ttcttttttag tgcaatggaa
1380

ttagaaactg cagtaagatt aaaagcacct atagtacata tagtatggaa tgatagtact
1440

tatgatatgg tagcatttca acaattaaaa aaatataata gaactagtgc agtagatttt
1500

ggaaatatag atatagtaaa atatgcagaa agttttggag caacaggatt aagagtagaa
1560

agtcctgatc aattagcaga tgtacttaga cagggaatga atgcagaagg accagtaata
1620

attgatgtac ctgtagatta tagtgataat ataaatttag caagtgataa attacctaaa
1680

gaatttggag aattaatgaa aactaaagca ttataagagc tc
1722

<210> 20
<211> 570
<212> PRT

<213> Bacillus subtilis

<400> 20

Met Thr Lys Ala Thr Lys Glu Gln Lys Ser Leu Val Lys Asn Arg Gly
 1 5 10 15

Ala Glu Leu Val Val Asp Cys Leu Val Glu Gln Gly Val Thr His Val
 20 25 30

Phe Gly Ile Pro Gly Ala Lys Ile Asp Ala Val Phe Asp Ala Leu Gln
 35 40 45

Asp Lys Gly Pro Glu Ile Ile Val Ala Arg His Glu Gln Asn Ala Ala
 50 55 60

Phe Met Ala Gln Ala Val Gly Arg Leu Thr Gly Lys Pro Gly Val Val
 65 70 75 80

Leu Val Thr Ser Gly Pro Gly Ala Ser Asn Leu Ala Thr Gly Leu Leu
 85 90 95

Thr Ala Asn Thr Glu Gly Asp Pro Val Val Ala Leu Ala Gly Asn Val
 100 105 110

Ile Arg Ala Asp Arg Leu Lys Arg Thr His Gln Ser Leu Asp Asn Ala
 115 120 125

Ala Leu Phe Gln Pro Ile Thr Lys Tyr Ser Val Glu Val Gln Asp Val
 130 135 140

Lys Asn Ile Pro Glu Ala Val Thr Asn Ala Phe Arg Ile Ala Ser Ala
 145 150 155 160

Gly Gln Ala Gly Ala Ala Phe Val Ser Phe Pro Gln Asp Val Val Asn
 165 170 175

Glu Val Thr Asn Thr Lys Asn Val Arg Ala Val Ala Ala Pro Lys Leu
 180 185 190

Gly Pro Ala Ala Asp Asp Ala Ile Ser Ala Ala Ile Ala Lys Ile Gln
 195 200 205

Thr Ala Lys Leu Pro Val Val Leu Val Gly Met Lys Gly Gly Arg Pro
 210 215 220

Glu Ala Ile Lys Ala Val Arg Lys Leu Leu Lys Lys Val Gln Leu Pro

035950

225					230						235				240
Phe	Val	Glu	Thr	Tyr	Gln	Ala	Ala	Gly	Thr	Leu	Ser	Arg	Asp	Leu	Glu
				245					250					255	
Asp	Gln	Tyr	Phe	Gly	Arg	Ile	Gly	Leu	Phe	Arg	Asn	Gln	Pro	Gly	Asp
			260					265					270		
Leu	Leu	Leu	Glu	Gln	Ala	Asp	Val	Val	Leu	Thr	Ile	Gly	Tyr	Asp	Pro
		275					280					285			
Ile	Glu	Tyr	Asp	Pro	Lys	Phe	Trp	Asn	Ile	Asn	Gly	Asp	Arg	Thr	Ile
	290					295					300				
Ile	His	Leu	Asp	Glu	Ile	Ile	Ala	Asp	Ile	Asp	His	Ala	Tyr	Gln	Pro
305					310					315					320
Asp	Leu	Glu	Leu	Ile	Gly	Asp	Ile	Pro	Ser	Thr	Ile	Asn	His	Ile	Glu
				325					330					335	
His	Asp	Ala	Val	Lys	Val	Glu	Phe	Ala	Glu	Arg	Glu	Gln	Lys	Ile	Leu
			340					345					350		
Ser	Asp	Leu	Lys	Gln	Tyr	Met	His	Glu	Gly	Glu	Gln	Val	Pro	Ala	Asp
		355					360					365			
Trp	Lys	Ser	Asp	Arg	Ala	His	Pro	Leu	Glu	Ile	Val	Lys	Glu	Leu	Arg
	370					375					380				
Asn	Ala	Val	Asp	Asp	His	Val	Thr	Val	Thr	Cys	Asp	Ile	Gly	Ser	His
385					390					395					400
Ala	Ile	Trp	Met	Ser	Arg	Tyr	Phe	Arg	Ser	Tyr	Glu	Pro	Leu	Thr	Leu
				405					410					415	
Met	Ile	Ser	Asn	Gly	Met	Gln	Thr	Leu	Gly	Val	Ala	Leu	Pro	Trp	Ala
			420					425					430		
Ile	Gly	Ala	Ser	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Glu	Lys	Val	Val	Ser	Val	Ser
	435						440					445			
Gly	Asp	Gly	Gly	Phe	Leu	Phe	Ser	Ala	Met	Glu	Leu	Glu	Thr	Ala	Val
	450					455					460				
Arg	Leu	Lys	Ala	Pro	Ile	Val	His	Ile	Val	Trp	Asn	Asp	Ser	Thr	Tyr
465					470					475					480

035950

Asp Met Val Ala Phe Gln Gln Leu Lys Lys Tyr Asn Arg Thr Ser Ala
485 490 495

Val Asp Phe Gly Asn Ile Asp Ile Val Lys Tyr Ala Glu Ser Phe Gly
500 505 510

Ala Thr Gly Leu Arg Val Glu Ser Pro Asp Gln Leu Ala Asp Val Leu
515 520 525

Arg Gln Gly Met Asn Ala Glu Gly Pro Val Ile Ile Asp Val Pro Val
530 535 540

Asp Tyr Ser Asp Asn Ile Asn Leu Ala Ser Asp Lys Leu Pro Lys Glu
545 550 555 560

Phe Gly Glu Leu Met Lys Thr Lys Ala Leu
565 570

<210> 21
<211> 720
<212> DNA
<213> Clostridium autoethanogenum LZ1561

<400> 21
atggatgatg aggtgaaagt cccaaaccat atatatcaaa tgtctacaat aaatgcactt
60

gtttcggggc tgtatgatgg ctgtgtttca ttatctaaac ttcttaaaaa aggaaacttt
120

ggtataggta cttttaaaagg tctagatggg gaactaactc ttttaaattg aactttttat
180

aggactaaac ctgatggcag cgtatacgta tgttccaaaa acgtatccgt tccttttgct
240

gtagtcactg aactggaaaa ttataatact tataatatc aaaatcgtag ttcttatgaa
300

gatataagaa aagaattgga cagctttata gaaagcaaaa atatatttta tgctttctat
360

atggaaggta aatttaatta tgtaaaaaca cgtactgttg taaaacagaa tatgccttat
420

aagcctatgg ctgaagttgt taaagatcag cctatgtttg aatataacgg tgttgatgga
480

tatgtggttg gatttaggtg tcctgattat gttgaaggcc ttaatgtccc tggatatcat
540

tttcatttca taaataaaga taagaaattt ggtggacata taagtgaatt ttccattgaa
600

035950

aatgcgaagg tttatgtaca gaactgttct tgcttttagga tggaacttcc taaaaatgaa
660

agtttttata atatggaagt acaagataga aacgatgaga taacaagtgt tgaaaaataa
720

<210> 22

<211> 239

<212> PRT

<213> Clostridium autoethanogenum LZ1561

<400> 22

Met Asp Asp Glu Val Lys Val Pro Asn His Ile Tyr Gln Met Ser Thr
1 5 10 15

Ile Asn Ala Leu Val Ser Gly Leu Tyr Asp Gly Cys Val Ser Leu Ser
20 25 30

Lys Leu Leu Lys Lys Gly Asn Phe Gly Ile Gly Thr Phe Lys Gly Leu
35 40 45

Asp Gly Glu Leu Thr Leu Leu Asn Gly Thr Phe Tyr Arg Thr Lys Pro
50 55 60

Asp Gly Ser Val Tyr Val Cys Ser Lys Asn Val Ser Val Pro Phe Ala
65 70 75 80

Val Val Thr Glu Leu Glu Asn Tyr Asn Thr Tyr Asn Ile Gln Asn Arg
85 90 95

Thr Ser Tyr Glu Asp Ile Arg Lys Glu Leu Asp Ser Phe Ile Glu Ser
100 105 110

Lys Asn Ile Phe Tyr Ala Phe Tyr Met Glu Gly Lys Phe Asn Tyr Val
115 120 125

Lys Thr Arg Thr Val Val Lys Gln Asn Met Pro Tyr Lys Pro Met Ala
130 135 140

Glu Val Val Lys Asp Gln Pro Met Phe Glu Tyr Asn Gly Val Asp Gly
145 150 155 160

Tyr Val Val Gly Phe Arg Cys Pro Asp Tyr Val Glu Gly Leu Asn Val
165 170 175

Pro Gly Tyr His Phe His Phe Ile Asn Lys Asp Lys Lys Phe Gly Gly
180 185 190

035950

His Ile Ser Glu Phe Ser Ile Glu Asn Ala Lys Val Tyr Val Gln Asn
195 200 205

Cys Ser Cys Phe Arg Met Glu Leu Pro Lys Asn Glu Ser Phe Tyr Asn
210 215 220

Met Glu Val Gln Asp Arg Asn Asp Glu Ile Thr Ser Val Glu Lys
225 230 235

<210> 23

<211> 745

<212> DNA

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Оптимизированная по кодону ацетолактат декарбоксилаза,
Clostridium autoethanogenum LZ1561

<400> 23

gagctcagga ggtaactaaa tggatgatga agtaaaagta cctaatacata tatatcaaatt
60

gagtactata aatgcattag taagtggatt atatgatgga tgtgtaagtt tatctaaatt
120

attaaaaaaaa ggaaattttg gaataggaac ttttaaagga ttagatggag aattaacttt
180

attaaatgga actttttata gaactaaacc tgatggaagt gtatatgtat gtagtaaaaa
240

tgtaagtgta ccttttgcag tagtaactga attagaaaat tataatactt ataatataca
300

aaatagaact tcttatgaag atataagaaa agaattagat agttttatag aaagtaaaaa
360

tatattttat gcattttata tggaaggaaa atttaattat gtaaaaacta gaactgtagt
420

aaaacaaaat atgccttata aacctatggc agaagtagta aaagatcaac ctatgtttga
480

atataatgga gtagatggat atgtagtagg atttagatgt cctgattatg tagaaggatt
540

aatgtacct ggatatcatt ttcattttat aaataaagat aaaaaatttg gaggacatat
600

aagtgaattt agtatagaaa atgcaaaagt atatgtacaa aattgtagtt gttttagaat
660

ggaattacct aaaaatgaaa gtttttataa tatggaagta caagatagaa atgatgaaat
720

aactagtgtgta gaaaaataag gtacc
745

<210> 24
<211> 239
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Оптимизированная по кодону ацетолактат декарбоксилаза,
Clostridium autoethanogenum LZ1561

<400> 24

Met Asp Asp Glu Val Lys Val Pro Asn His Ile Tyr Gln Met Ser Thr
1 5 10 15

Ile Asn Ala Leu Val Ser Gly Leu Tyr Asp Gly Cys Val Ser Leu Ser
20 25 30

Lys Leu Leu Lys Lys Gly Asn Phe Gly Ile Gly Thr Phe Lys Gly Leu
35 40 45

Asp Gly Glu Leu Thr Leu Leu Asn Gly Thr Phe Tyr Arg Thr Lys Pro
50 55 60

Asp Gly Ser Val Tyr Val Cys Ser Lys Asn Val Ser Val Pro Phe Ala
65 70 75 80

Val Val Thr Glu Leu Glu Asn Tyr Asn Thr Tyr Asn Ile Gln Asn Arg
85 90 95

Thr Ser Tyr Glu Asp Ile Arg Lys Glu Leu Asp Ser Phe Ile Glu Ser
100 105 110

Lys Asn Ile Phe Tyr Ala Phe Tyr Met Glu Gly Lys Phe Asn Tyr Val
115 120 125

Lys Thr Arg Thr Val Val Lys Gln Asn Met Pro Tyr Lys Pro Met Ala
130 135 140

Glu Val Val Lys Asp Gln Pro Met Phe Glu Tyr Asn Gly Val Asp Gly
145 150 155 160

Tyr Val Val Gly Phe Arg Cys Pro Asp Tyr Val Glu Gly Leu Asn Val
165 170 175

Pro Gly Tyr His Phe His Phe Ile Asn Lys Asp Lys Lys Phe Gly Gly
180 185 190

035950

His Ile Ser Glu Phe Ser Ile Glu Asn Ala Lys Val Tyr Val Gln Asn
195 200 205

Cys Ser Cys Phe Arg Met Glu Leu Pro Lys Asn Glu Ser Phe Tyr Asn
210 215 220

Met Glu Val Gln Asp Arg Asn Asp Glu Ile Thr Ser Val Glu Lys
225 230 235

<210> 25

<211> 806

<212> DNA

<213> Aeromonas hydrophila

<400> 25

gagctctaag gaggtcggac atggaaaacta atagtagttg tgattgtgca atagaaataa
60

gtcaacaatt tgcaagatgg caggcaagac aagtggtgg tgaagtatat caaagtagtc
120

ttatgagtgc attattagct ggtgtatatg aagtgaaac tactatggca gatttactta
180

gacatggtga ttttggatta ggaactttta atagattaga tggagaatta atagcatttg
240

aaagacaaat acatcaatta aaagcagatg gaagtgaag acctgcaaga gcagaacaaa
300

aaactccttt tgcagtaatg actcatttta gaccttggtt acaaagaaga tttgcacatc
360

ctttaagtag agaagaaata catcagtggg tagatagatt agtaggaact gataatgtat
420

ttgtagcatt tagacttgat ggattatgtg aacaagcaca agtaagaact gtaccttgtc
480

aaagtcctcc ttataaacct atgtagaag caatagaagc acaaccttta tttagtttta
540

gtttaagaag aggaacttta gtaggattta gatgtcctcc tttgtacag ggaataaatg
600

tagcaggata tcatgaacat tttataactg aagatagaag agtggtgga catatattag
660

attatgcaat gggacatgga caattacaat taagtgtagt acaacatctt aatatagaat
720

tacctagaaa tcctgcattt caacaagcag atcttaatcc tgcagattta gatagagcaa
780

taagagcagc agaaggataa ggtacc
806

035950

<210> 26
 <211> 259
 <212> PRT
 <213> Aeromonas hydrophila

<400> 26

Met Glu Thr Asn Ser Ser Cys Asp Cys Ala Ile Glu Ile Ser Gln Gln
 1 5 10 15

Phe Ala Arg Trp Gln Ala Arg Gln Gly Gly Gly Glu Val Tyr Gln Ser
 20 25 30

Ser Leu Met Ser Ala Leu Leu Ala Gly Val Tyr Glu Gly Glu Thr Thr
 35 40 45

Met Ala Asp Leu Leu Arg His Gly Asp Phe Gly Leu Gly Thr Phe Asn
 50 55 60

Arg Leu Asp Gly Glu Leu Ile Ala Phe Glu Arg Gln Ile His Gln Leu
 65 70 75 80

Lys Ala Asp Gly Ser Ala Arg Pro Ala Arg Ala Glu Gln Lys Thr Pro
 85 90 95

Phe Ala Val Met Thr His Phe Arg Pro Cys Leu Gln Arg Arg Phe Ala
 100 105 110

His Pro Leu Ser Arg Glu Glu Ile His Gln Trp Val Asp Arg Leu Val
 115 120 125

Gly Thr Asp Asn Val Phe Val Ala Phe Arg Leu Asp Gly Leu Phe Glu
 130 135 140

Gln Ala Gln Val Arg Thr Val Pro Cys Gln Ser Pro Pro Tyr Lys Pro
 145 150 155 160

Met Leu Glu Ala Ile Glu Ala Gln Pro Leu Phe Ser Phe Ser Leu Arg
 165 170 175

Arg Gly Thr Leu Val Gly Phe Arg Cys Pro Pro Phe Val Gln Gly Ile
 180 185 190

Asn Val Ala Gly Tyr His Glu His Phe Ile Thr Glu Asp Arg Arg Gly
 195 200 205

035950

Gly Gly His Ile Leu Asp Tyr Ala Met Gly His Gly Gln Leu Gln Leu
210 215 220

Ser Val Val Gln His Leu Asn Ile Glu Leu Pro Arg Asn Pro Ala Phe
225 230 235 240

Gln Gln Ala Asp Leu Asn Pro Ala Asp Leu Asp Arg Ala Ile Arg Ala
245 250 255

Ala Glu Gly

<210> 27

<211> 761

<212> DNA

<213> Leuconostoc lactis

<400> 27

gagctctaag gaggtcggac atgactcatc aatataataa aatgagtaga ttatatcaac
60

atggaacttt agcaatgtta atgggaaaac aaatgcaggg aactataact gtagcagaac
120

ttagacaaca tggatgatact ggaataggaa ctcttactgg attagatggg gaagtaatac
180

ttcttgatgg tgaagtttat caagcacaga gtgatggaca agtaaatac atactaatc
240

ctgatacttt aatgcctttt gcaagtgtac attttgatgc acctactcag cagttacctt
300

ttagtcaggt agatttttagt actttaagtg caaaacttaa agcagaacaa ttacaaaatg
360

tatttgcagc agtgaaattt catggtgaat ttagtagagt acatgtaaga atagctccta
420

aacaagtacc tccttatcct tcattacttg cagtagcaga aaatcaacct gaatttgaaa
480

gagaacacgt aactggaact gtagtaggat actttgcacc tcaaataatt aatggaccta
540

ctgcagcagg atggcatgta cattttctta gtgatgatct tcaatttgca ggacatatat
600

tagatttttag tgcaagtcaa ataagtggaa ctttacaaat atttgatgaa tttgtacaac
660

atttacctat acatgatcct gcatatagag aaatgacttt agattttgat ggattattag
720

ctggaataga agcaagtga ggtggacaac aataaggtac c
761

035950

<210> 28
 <211> 244
 <212> PRT
 <213> Leuconostoc lactis

<400> 28

Met Thr His Gln Tyr Asn Lys Met Ser Arg Leu Tyr Gln His Gly Thr
 1 5 10 15

Leu Ala Met Leu Met Gly Lys Gln Met Gln Gly Thr Ile Thr Val Ala
 20 25 30

Glu Leu Arg Gln His Gly Asp Thr Gly Ile Gly Thr Leu Thr Gly Leu
 35 40 45

Asp Gly Glu Val Ile Leu Leu Asp Gly Glu Val Tyr Gln Ala Gln Ser
 50 55 60

Asp Gly Gln Val Asn His Ile Thr Asn Pro Asp Thr Leu Met Pro Phe
 65 70 75 80

Ala Ser Val His Phe Asp Ala Pro Thr Gln Gln Leu Pro Phe Ser Gln
 85 90 95

Val Asp Phe Ser Thr Leu Ser Ala Lys Leu Lys Ala Glu Gln Leu Gln
 100 105 110

Asn Val Phe Ala Ala Val Lys Phe His Gly Glu Phe Ser Arg Val His
 115 120 125

Val Arg Ile Ala Pro Lys Gln Val Pro Pro Tyr Pro Ser Leu Leu Ala
 130 135 140

Val Ala Glu Asn Gln Pro Glu Phe Glu Arg Glu His Val Thr Gly Thr
 145 150 155 160

Val Val Gly Tyr Phe Ala Pro Gln Ile Phe Asn Gly Pro Thr Ala Ala
 165 170 175

Gly Trp His Val His Phe Leu Ser Asp Asp Leu Gln Phe Ala Gly His
 180 185 190

Ile Leu Asp Phe Ser Ala Ser Gln Ile Ser Gly Thr Leu Gln Ile Phe
 195 200 205

Asp Glu Phe Val Gln His Leu Pro Ile His Asp Pro Ala Tyr Arg Glu
 210 215 220

Met Thr Leu Asp Phe Asp Gly Leu Leu Ala Gly Ile Glu Ala Ser Glu
 225 230 235 240

Gly Gly Gln Gln

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Рекомбинантная, карбоксидотрофная бактерия *Clostridium*, содержащая один или более ферментов, выбранных из группы, состоящей из пируват:ферредоксин-оксидоредуктазы (ЕС 1.2.7.1), ацетолактатсинтазы (ЕС 2.2.1.6) и ацетолактат декарбоксилазы (ЕС 4.1.1.5), причем каждый фермент представляет собой сверхэкспрессируемый эндогенный фермент или экзогенный фермент, при этом бактерия получена из *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* или *Clostridium ragsdalei*, и при этом бактерия продуцирует 2,3-бутандиол и ацетат.

2. Бактерия по п.1, содержащая пируват:ферредоксин-оксидоредуктазу и ацетолактатсинтазу.

3. Бактерия по п.1, содержащая пируват:ферредоксин-оксидоредуктазу и ацетолактат декарбоксилазу.

4. Бактерия по п.1, содержащая ацетолактатсинтазу и ацетолактат декарбоксилазу.

5. Бактерия по п.1, содержащая пируват:ферредоксин-оксидоредуктазу, ацетолактатсинтазу и ацетолактат декарбоксилазу.

6. Бактерия по п.1, отличающаяся тем, что фермент представляет собой сверхэкспрессируемую эндогенную пируват:ферредоксин-оксидоредуктазу.

7. Бактерия по п.1, отличающаяся тем, что фермент представляет собой экзогенную пируват:ферредоксин-оксидоредуктазу *Desulfovibrio africanus*.

8. Бактерия по п.1, отличающаяся тем, что фермент представляет собой сверхэкспрессируемую эндогенную PivB ацетолактатсинтазу, имеющую последовательность SEQ ID NO: 8, сверхэкспрессируемую эндогенную PivB ацетолактатсинтазу, имеющую последовательность SEQ ID NO: 10, сверхэкспрессируемую эндогенную PivN ацетолактатсинтазу или сверхэкспрессируемую эндогенную AlsS ацетолактатсинтазу.

9. Бактерия по п.1, отличающаяся тем, что фермент представляет собой экзогенную ацетолактатсинтазу *Bacillus subtilis*.

10. Бактерия по п.1, отличающаяся тем, что фермент является сверхэкспрессируемой эндогенной AlsD ацетолактат декарбоксилазой или сверхэкспрессируемой эндогенной BudA ацетолактат декарбоксилазой.

11. Бактерия по п.1, отличающаяся тем, что фермент представляет собой экзогенную ацетолактат декарбоксилазу *Aeromonas hydrophila*.

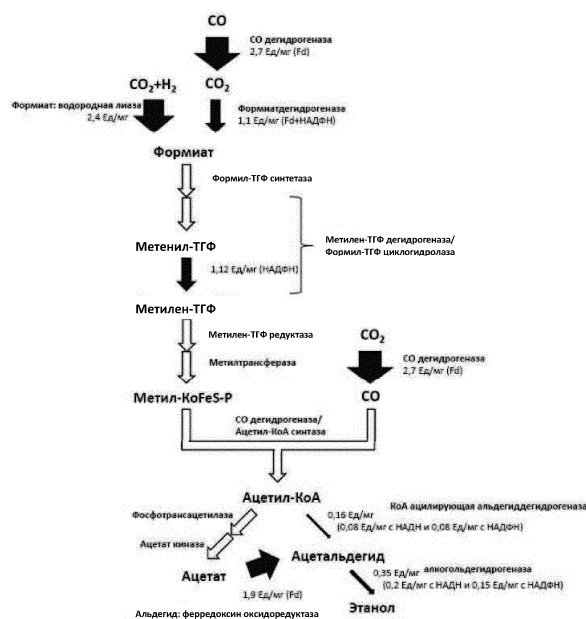
12. Бактерия по п.1, отличающаяся тем, что фермент представляет собой экзогенную ацетолактат декарбоксилазу *Leuconostoc lactis*.

13. Бактерия по п.1, отличающаяся тем, что бактерия получена из *Clostridium autoethanogenum*.

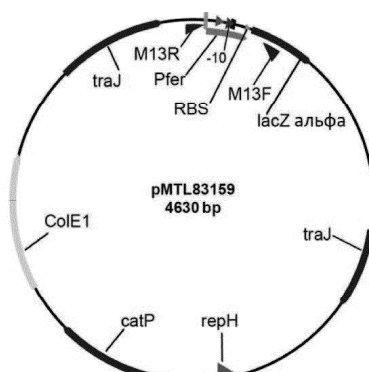
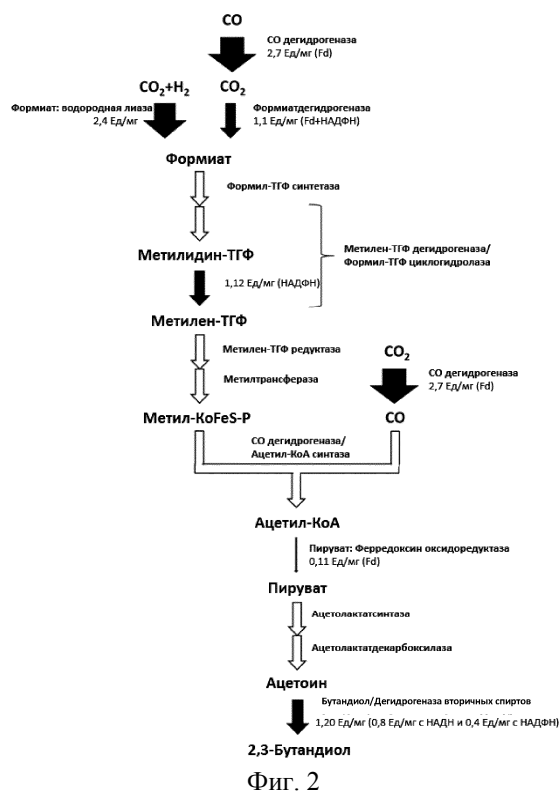
14. Бактерия по п.1, отличающаяся тем, что бактерия получена из *Clostridium autoethanogenum*, сохраненной под номером доступа DSMZ DSM23693.

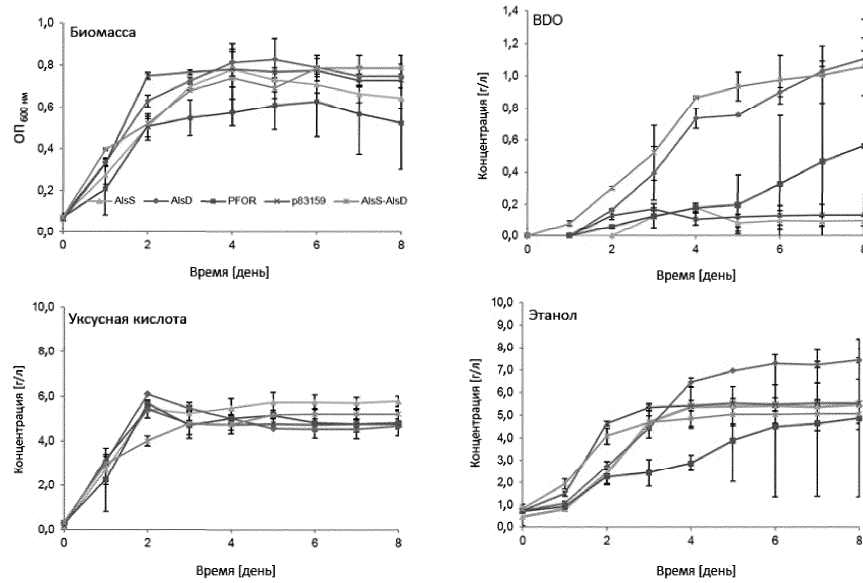
15. Способ получения 2,3-бутандиола, включающий ферментацию бактерии по п.1 в присутствии газообразного субстрата, содержащего CO.

16. Способ по п.15, отличающийся тем, что бактерия дополнительно продуцирует этанол, бутанол, изопропанол, изобутанол, высшие спирты, бутандиол, сукцинат, изопреноиды, жирные кислоты и/или их смеси.

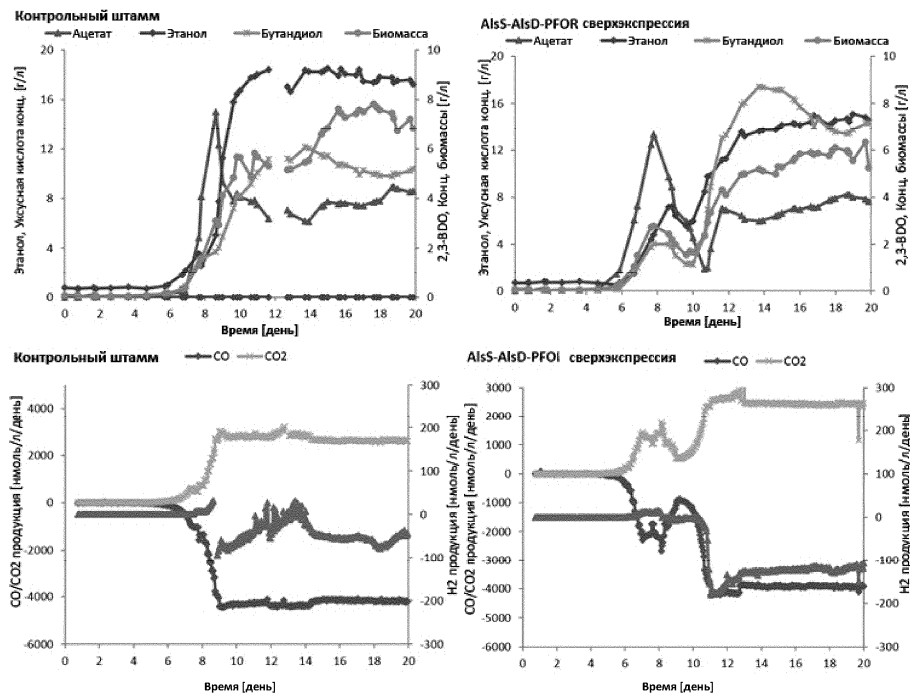


Фиг. 1

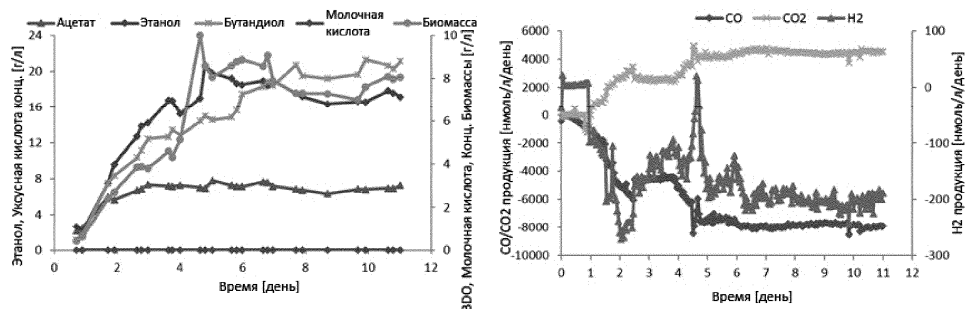




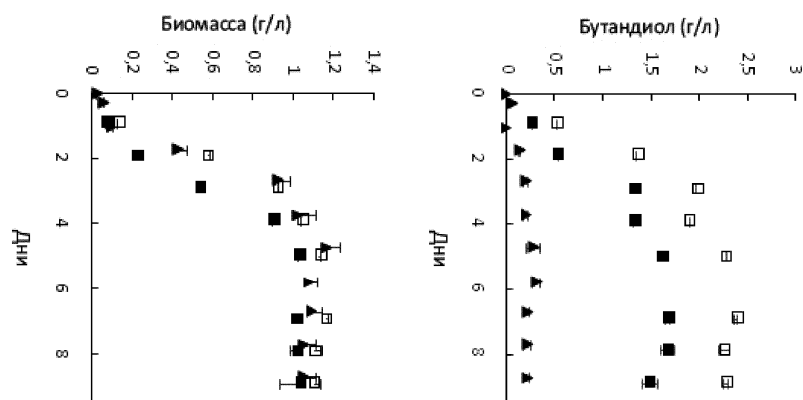
Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8

