

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **036071**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2020.09.22**

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

**(21)** Номер заявки  
**201691383**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2015.01.29**

---

**(54) РЕКОМБИНАНТНЫЕ КАРБОКСИТРОФНЫЕ АЦЕТОГЕННЫЕ БАКТЕРИИ И СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ПРОДУКТОВ ПРИ ИХ КУЛЬТИВИРОВАНИИ**

---

**(31)** 61/933,815; 61/944,541

**(32)** 2014.01.30; 2014.02.25

**(33)** US

**(43)** 2017.01.30

**(86)** PCT/US2015/013625

**(87)** WO 2015/116874 2015.08.06

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

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

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

**(56)** KITA, AKIHISA et al., "Development of genetic transformation and heterologous expression system in carboxydrotrophic thermophilic acetogen Moorella thermoacetica", Journal of Bioscience and Bioengineering, 2013, Vol. 115, No. 4, p. 347-352. See abstract; pages 349-351

WO-A2-2013115659

US-A1-20130323820

BENGELSDORF, FRANK R. et al., "Bacterial synthesis gas (syngas) fermentation", Environmental Technology, 2013, Vol. 34, Nos. 13-14, p. 1639-1651. See the whole document

ABRINI, JAMAL et al., "Clostridium autoethanogenum, sp. nov., an anaerobic bacterium that produces ethanol from carbon monoxide", Archives of Microbiology, 1994, Vol. 161, No. 4, p. 345-351. See the whole document

---

**(57)** В изобретении предложена карбокситрофная ацетогенная бактерия *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium Ijungdahlii* или *Clostridium ragsdalei*, содержащая нарушающую мутацию в гене, кодирующем фермент лактатдегидрогеназу, причем нарушающая мутация уменьшает или устраняет экспрессию или активность указанного фермента таким образом, что указанная бактерия продуцирует уменьшенное количество лактата по сравнению с исходной бактерией или не продуцирует лактат. Также предложен способ получения продукта, выбранного из этанола, 2,3-бутандиола, формиата, пирувата, сукцината, валина, лейцина, изолейцина, малагата, fumarата, 2-оксоглутарата, цитрата и цитрамалата, при культивировании указанной бактерии в присутствии субстрата, содержащего монооксид углерода.

---

**036071 B1**

**036071 B1**

### **Перекрестная ссылка на родственные заявки**

Заявка на данное изобретение испрашивает приоритет по предварительной заявке на патент США 61/933815, поданной 30 января 2014 г, и предварительной заявке на патент США 61/944541, поданной 25 февраля 2014 г, которые в полном объеме включены в настоящий документ посредством ссылки.

### **Перечень последовательностей**

Настоящий документ содержит перечень последовательностей нуклеотидов/аминокислот, предоставленный одновременно с заявкой на данное изобретение и определенный следующим образом: файл 23322 байт ASCII (текст) с названием "LT102WO1\_ST25.txt", созданный 29 января 2015 г., который в полном объеме включен в настоящий документ посредством ссылки.

### **Уровень техники**

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

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

Например, ацетогены, такие как *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium ragsdalei* (Körpe, Appl. Environ Microbiol., 77:5467-5475, 2011) и *Butyribacterium methylophilum* (Heiskanen, Enzyme Microb Technol, 41:362-367, 2007), могут продуцировать лактат в качестве побочного продукта. Это продуцирование лактата снижает эффективность и выход целевых продуктов, таких как бутанол, этанол или 2,3-бутандиол. Кроме того, лактат может быть токсичен для ацетогенов, таких как *Clostridium autoethanogenum*, даже в низких концентрациях (Körpe, Appl. Environ Microbiol., 77:5467-5475, 2011), и может служить в качестве субстрата для других бактерий, что приводит к большей вероятности бактериальной контаминации при продуцировании лактата. Кроме того, отделение лактата от других продуктов, таких как этанол, может потребовать трудоемких стадий обработки.

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

### **Краткое описание изобретения**

В настоящем изобретении предложена карбокситрофная ацетогенная бактерия, содержащая нарушающую мутацию в гене, кодирующем фермент пути биосинтеза лактата. В одном варианте реализации нарушающая мутация уменьшает или устраняет экспрессию или активность фермента лактатдегидрогеназы. Указанная бактерия представляет собой *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* или *Clostridium ragsdalei*. Нарушающая мутация влияет на способность бактерии продуцировать лактат. В одном варианте реализации бактерия согласно настоящему изобретению продуцирует уменьшенное количество лактата по сравнению с бактерией дикого типа. В одном варианте реализации бактерия согласно настоящему изобретению не продуцирует лактат.

Бактерия согласно настоящему изобретению может продуцировать продукты, такие как одно или несколько из следующих веществ: этанол, 2,3-бутандиол, формиат, пируват, сукцинат, валин, лейцин, изолейцин, малат, фумарат, 2-оксоглутарат, цитрат и цитрамалат.

В одном варианте реализации бактерия согласно настоящему изобретению продуцирует увеличенное по сравнению с бактерией дикого типа количество одного или нескольких из следующих веществ: этанол, 2,3-бутандиол, формиат, пируват, сукцинат, валин, лейцин, изолейцин, малат, фумарат, 2-оксоглутарат, цитрат и цитрамалат. В одном варианте реализации фермент пути биосинтеза лактата представляет собой фермент, который исходно преобразует пируват в лактат. В предпочтительном варианте реализации фермент пути биосинтеза лактата представляет собой лактатдегидрогеназу (ЛДГ).

В предпочтительном варианте реализации бактерия представляет собой *Clostridium autoethanogenum* DSM23693.

В настоящем изобретении также предложен способ получения продукта, выбранного из этанола, 2,3-бутандиола, формиата, пирувата, сукцината, валина, лейцина, изолейцина, малата, фумарата, 2-оксоглутарата, цитрата и цитрамалата, при культивировании бактерии согласно изобретению в присутствии субстрата, содержащего CO.

### Краткое описание чертежей

На фиг. 1 представлены диаграмма, показывающая стратегию нокаутирования ЛДГ, и праймеры, используемые для скрининга.

Фиг. 2 представляет собой набор изображений гелей. На первом изображении геля показан скрининг на интеграцию одиночного кроссинговера плазмиды с нокаутом с использованием праймеров Og24r/Og35f для 5' кроссинговера и Og21f/Og36g для 3' кроссинговера у дикого типа (w) и трансконъюгантного клона 6 (6). На втором изображении геля показан скрининг на наличие двойного кроссинговера с использованием внешних праймеров, фланкирующих Og35f/Og36g и Og21f/Og24r.

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

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

На фиг. 5A представлен график, иллюстрирующий ВЭЖХ-анализ *C. autoethanogenum* после 6 дней роста в бутылках для сыворотки при давлении 30 фунтов/кв. дюйм (206843 Па) отработанного газа с металлургического производства (44% CO, 22% CO<sub>2</sub>, 2% H<sub>2</sub>, 32% N<sub>2</sub>) в качестве субстрата.

На фиг. 5B представлен график, иллюстрирующий ВЭЖХ-анализ *C. autoethanogenum* с инактивированной лактатдегидрогеназой после 6 дней роста в бутылках для сыворотки при давлении 30 фунтов/кв. дюйм (206843 Па) отработанного газа с металлургического производства (44% CO, 22% CO<sub>2</sub>, 2% H<sub>2</sub>, 32% N<sub>2</sub>) в качестве субстрата.

### Подробное описание изобретения

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

В настоящем изобретении предложена карбокситрофная ацетогенная бактерия, содержащая нарушающую мутацию в ферменте пути биосинтеза лактата. "Мутация" относится к модификации нуклеиновой кислоты или белка в бактерии согласно настоящему изобретению по сравнению с диким типом или исходным микроорганизмом, из которых происходит бактерия согласно настоящему изобретению. Термин "генетическая модификация" включает в себя термин "мутация". В одном варианте реализации мутация может представлять собой делецию, вставку или замену одного или более нуклеотидов в гене, кодирующем фермент. В другом варианте реализации мутация может представлять собой делецию, вставку или замену одной или более аминокислот в ферменте.

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

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

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

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

"Путь биосинтеза лактата" представляет собой путь реакций, приводящих к образованию лактата. В одном варианте реализации путь биосинтеза лактата включает один или более ферментов, которые преобразуют пируват в лактат. В другом варианте реализации путь биосинтеза лактата включает фермент лактатдегидрогеназу. В зависимости от бактерии, в путь биосинтеза лактата могут быть вовлечены ряд различных ферментов. Когда бактерия содержит два или более фермента в пути биосинтеза лактата, например два или более фермента, способных превращать пируват в лактат, нарушение более чем одного такого фермента может приводить к увеличению выработки продукта выше уровня, который можно достигнуть путем нарушения одного фермента. В одном варианте реализации бактерия содержит нарушающие мутации в двух, трех, четырех, пяти или более ферментах, способных превращать пируват в лактат. В то время как нарушение экспрессии и/или активности всех таких ферментов может обеспечивать некоторые преимущества с точки зрения выработки продукции, обычно нет необходимости нарушать экспрессию и/или активность всех таких ферментов, чтобы получить преимущества изобретения, а именно увеличение выработки одного или более основных или целевых продуктов.

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

В предпочтительном варианте реализации фермент пути биосинтеза лактата представляет собой лактатдегидрогеназу (ЛДГ). Внесение нарушающей мутации в ЛДГ уменьшает или устраняет (т.е. "нарушает") экспрессию или активность ЛДГ. Бактерия согласно настоящему изобретению может содержать одну или более других генетических модификаций в дополнение к нарушающей мутации в ферменте пути биосинтеза лактата, включая генетические модификации одного или более генов или белков, не

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

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

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

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

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

Нуклеиновые кислоты могут быть доставлены в бактерию согласно настоящему изобретению с использованием любого способа, известного в данной области техники. Например, нуклеиновые кислоты могут быть доставлены в виде "голых" нуклеиновых кислот или могут быть приготовлены с одним или более агентами (например, липосомы). В определенных вариантах реализации могут применяться ингибиторы рестрикции (Murray, *Microbiol. Molec. Biol. Rev.*, 64:412-434, 2000). В качестве примера трансформацию (включая трансдукцию или трансфекцию) можно достигнуть при помощи электропорации, обработки ультразвуком, полиэтиленгликоль-опосредованной трансформации, химической или природной компетентности, трансформации протопластов, индукции профага или конъюгации (см., например, Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989). Использование электропорации сообщалось для нескольких карбокситрофных ацетогенов, включая *Clostridium ljungdahlii* (Koepke, *PNAS*, 107:13087-13092, 2010; WO 2012/053905), *Clostridium autoethanogenum* (WO 2012/053905), *Clostridium acetivum* (Schiel-Bengelsdorf, *Synthetic Biol.*, 15:2191-2198, 2012) и *Acetobacterium woodii* (Strätz, *Appl. Environ. Microbiol.*, 60:1033-1037, 1994). Использование электропорации также сообщалось для *Clostridia*, включая *Clostridium acetobutylicum* (Mermelstein, *Biotechnol.*, 10:190-195, 1992) и *Clostridium cellulolyticum* (Jennert, *Microbiol.*, 146:3071-3080, 2000). Индукция профага была продемонстрирована для карбокситрофных ацетогенов, включая *Clostridium scatologenes* (Parthasarathy, *Development of a Genetic Modification System in Clostridium sca-*

tologenes ATCC 25775 for Generation of Mutants, Masters Project, Western Kentucky University, 2010), и конъюгация была описана для многих Clostridia, включая Clostridium difficile (Herbert, FEMS Microbiol. Lett., 229:103-110, 2003) и Clostridium acetobutylicum (Williams, J. Gen. Microbiol., 136:819-826, 1990). В некоторых вариантах реализации, имеющих активные ферментативные системы рестрикции, может быть необходимо метилирование нуклеиновой кислоты перед введением нуклеиновой кислоты в бактерию согласно изобретению (WO 2012/105853).

Термин "рекомбинантный" указывает на то, что нуклеиновая кислота, белок или микроорганизм являются продуктом генетической модификации, мутации или рекомбинации. В целом, термин "рекомбинантный" относится к нуклеиновой кислоте, белку или микроорганизму, который содержит или кодируется с помощью генетического материала, полученного из различных источников, таких как два или более различных штамма или вида микроорганизмов. Используемый в данном документе термин "рекомбинантный" также может быть использован для описания микроорганизма, который содержит мутантную нуклеиновую кислоту или белок, включая мутантную форму эндогенной нуклеиновой кислоты или белка. "Исходная бактерия" ("родительская бактерия") представляет собой бактерию, используемую для получения бактерии согласно настоящему изобретению. Исходная бактерия может представлять собой бактерию, встречающуюся в природе (т.е. бактерию дикого типа), или бактерию, которая была предварительно модифицирована (т.е. мутант или рекомбинантную бактерию). Бактерия согласно настоящему изобретению может быть модифицирована для того, чтобы экспрессировать меньшее количество фермента по сравнению с исходной бактерией, или бактерия согласно настоящему изобретению может быть модифицирована, чтобы не экспрессировать фермент, который экспрессируется исходной бактерией. В одном варианте реализации исходная бактерия представляет собой Clostridium autoethanogenum, Clostridium ljungdahlii или Clostridium ragsdalei. В предпочтительном варианте реализации исходная бактерия представляет собой Clostridium autoethanogenum, депонированную в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ) под номером доступа DSM23693 (т.е. Clostridium autoethanogenum LZ1561).

Термин "происходит из" указывает на то, что нуклеиновая кислота, белок или микроорганизм модифицированы или основаны на другой (например, исходной или дикого типа) нуклеиновой кислоте, белке или микроорганизме с получением новой нуклеиновой кислоты, белка или микроорганизма. Такие модификации или адаптации, как правило, включают вставку, делецию, мутацию или замену нуклеиновых кислот или генов. Обычно бактерия согласно настоящему изобретению происходит из исходной бактерии. В одном варианте реализации бактерия согласно настоящему изобретению происходит из Clostridium autoethanogenum, Clostridium ljungdahlii или Clostridium ragsdalei. В предпочтительном варианте реализации бактерия согласно настоящему изобретению происходит из Clostridium autoethanogenum LZ1561, которая депонирована в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ) под номером доступа DSM23693.

В одном варианте реализации исходная бактерия выбрана из группы, состоящей из карбокситрофных ацетогенных бактерий Clostridium autoethanogenum, Clostridium ljungdahlii и Clostridium ragsdalei. Данные карбокситрофные ацетогенные бактерии характеризуются способностью хемоавтотрофно расти на газообразных одноуглеродных источниках, таких как монооксид углерода (CO) и диоксид углерода (CO<sub>2</sub>), использовать монооксид углерода (CO) и/или водород (H<sub>2</sub>) в качестве источников энергии в анаэробных условиях и производить ацетил-КоА, ацетат и другие продукты. Они имеют один и тот же способ ферментации, путь Вуда-Льюнгаля или восстановительный путь ацетил-КоА и характеризуются наличием набора ферментов, состоящих из дегидрогеназы монооксида углерода (CODH), гидрогеназы, формилдегидрогеназы, формил-тетрафолатсинтетазы, метилен-тетрафолатдегидрогеназы, формил-тетрафолатциклолидазы, метилен-тетрафолатредуктазы, и дегидрогеназы монооксида углерода/ацетил-КоА-синтетазы (CODH/ACS), указанная комбинация характерна и уникальна для данного типа бактерий (Drake, The Prokaryotes, 354-420, Springer, New York, NY, 2006). В отличие от хемогетеротрофно растущих бактерий, сбраживающих сахара, которые преобразуют субстрат в биомассу, вторичные метаболиты и пируват из которых непосредственно или через ацетил-КоА образуются продукты, ацетогены преобразуют субстрат непосредственно в ацетил-КоА, из которых образуются продукты, биомасса и вторичные метаболиты.

В предпочтительном варианте реализации бактерия согласно настоящему изобретению происходит из исходного микроорганизма, содержащего лактатдегидрогеназу, при этом бактерия согласно настоящему изобретению содержит нарушающую мутацию в лактатдегидрогеназе. Например, исходный микроорганизм может представлять собой C. autoethanogenum, которая содержит последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую GenBank AEI90736.1, или аминокислотную последовательность, содержащую GenBank CP006763.1, KEGG CAETHG\_1147 или GenBank HQ876025.1. Исходный микроорганизм может представлять собой C. ljungdahlii, который содержит последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую GenBank YP\_003781368.1, или аминокислотную последовательность, содержащую GenBank CP001666.1 или KEGG CLJU\_c32190. Исходный микроорганизм может представлять собой C. ragsdalei, который содержит последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую GenBank AEI90737.1, или аминокислотную последовательность, содержащую GenBank HQ876026.1. Другие ис-

ходные бактерии могут иметь другие последовательности нуклеиновых кислот и аминокислотные последовательности.

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

Бактерия согласно настоящему изобретению может происходить из кластера карбокситрофных Clostridia, включая виды Clostridium autoethanogenum, Clostridium ljungdahlii, Clostridium ragsdalei и родственные изоляты, включая, но не ограничиваясь, штаммы Clostridium autoethanogenum JAI-1T (DSM10061) (Abrini, Arch. Microbiol., 161:345-351, 1994), Clostridium autoethanogenum LBS1560 (DSM19630) (WO 2009/064200), Clostridium autoethanogenum LZ1561 (DSM23693), Clostridium ljungdahlii PETCT (DSM13528 = ATCC 55383) (Tanner, Int. J. Syst. Bacteriol., 43:232-236, 1993), Clostridium ljungdahlii ERI-2 (ATCC 55380) (патент США № 5593886), Clostridium ljungdahlii C-01 (ATCC 55988) (патент США № 6368819), Clostridium ljungdahlii 0-52 (ATCC 55989) (патент США № 6368819), Clostridium ragsdalei P11T (ATCC BAA-622) (WO 2008/028055), родственные изоляты, такие как "Clostridium coskatii" (публикация патента США 2011/0229947), или мутантные штаммы, такие как Clostridium ljungdahlii OTA-1 (Tirado-Acevedo, Production of Bioethanol from Synthesis Gas Using Clostridium ljungdahlii, PhD thesis, North Carolina State University, 2010).

Данные штаммы образуют подкластер в пределах Clostridial pPHK кластера I, и их 16S pPHK ген более чем на 99% идентичен с аналогичным низким содержанием GC приблизительно 30%. Однако эксперименты ДНК-ДНК реассоциации и ДНК-дактилоскопии показали, что данные штаммы принадлежат к разным видам (WO 2008/028055). Штаммы этого кластера характеризуются общими чертами, имеют аналогичный генотип и фенотип, и все они имеют один и тот же способ сохранения энергии и ферментативного обмена веществ. Кроме того, у штаммов данного кластера отсутствуют цитохромы и сохранение энергии с помощью Rnf-комплекса. Все виды данного кластера имеют одинаковую морфологию и размер (логарифмические растущие клетки от 0,5-0,7×3-5 мкм), являются мезофильными (оптимальная температура роста между 30-37°C) и строго анаэробными (Abrini, Arch. Microbiol., 161:345-351, 1994; Tanner, Int. J. Syst. Bacteriol., 43:232-236, 1993 и WO 2008/028055). Более того, все они имеют одни и те же основные филогенетические черты, например, как один и тот же диапазон pH (pH 4-7,5, с оптимальным начальным pH 5,5-6), строго автотрофный рост на CO-содержащих газах с аналогичными темпами роста и аналогичным метаболическим профилем с этанолом и уксусной кислотой в качестве основных конечных продуктов ферментации, а также небольшим количеством 2,3-бутандиола и молочной кислоты, образующихся в определенных условиях (Abrini, Arch. Microbiol., 161:345-351, 1994; Köpke, Curr. Opin. Biotechnol., 22:320-325, 2011; Tanner, Int. J. Syst. Bacteriol., 43:232-236, 1993 и WO 2008/028055), а также наблюдается продуцирование индола во всех трех видах.

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

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

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

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

та в продукту.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Эксплуатация биореактора при увеличенном давлении позволяет увеличить скорость массопереноса CO из газовой фазы в жидкую фазу. Соответственно, в целом предпочтительно проводить культивирование/ферментацию при давлении выше атмосферного давления. Кроме того, поскольку данный коэффициент конверсии CO отчасти зависит от времени удерживания субстрата и время удерживания обуславливает необходимый объем биореактора, использование систем под давлением может значительно уменьшить требуемый объем биореактора и, следовательно, капитальные затраты на оборудование для культивирования/ферментации. В соответствии с примерами в патенте США № 5593886 объем реактора может быть прямо пропорционально уменьшен при увеличении рабочего давления в реакторе. Другими словами, для биореактора с рабочим давлением 10 атм необходима только одна десятая объема биореактора, работающего при давлении 1 атм. Кроме того, в WO 2002/008438 описана ферментация с превращением газа в этанол, выполняемая под давлением 30 и 75 фунтов/кв. дюйм избыточного давления, с получением продуктивности этанола 150 и 369 г/л/сут соответственно. В противоположность этому, было обнаружено, что при осуществлении ферментации с использованием аналогичных питательных сред и вводом композиций газов при атмосферном давлении получали от 10 до 20 раз меньше этанола на 1 л в сутки.

Способ по настоящему изобретению может дополнительно включать выделение или очистку одного или более продуктов. Например, этанол или смешанный поток спирта, содержащий этанола и/или другие продукты, можно выделить из ферментационного бульона любым способом, известным в данной области техники, включая фракционную перегонку, выпаривание, перапорацию или экстрактивную ферментацию (например, экстракцию жидкость-жидкость). Побочные продукты, такие как ацетат или кислоты, также можно извлечь из ферментационного бульона с использованием любого способа, известного в данной области техники, включая системы адсорбции с активированным углем, электродиализ или непрерывную отдувку газом. В одном варианте реализации продукт можно выделять из ферментационного бульона путем непрерывного удаления части бульона из биореактора, отделения микробных клеток от бульона (обычно путем фильтрации) и выделения продукта из бульона. Отделенные микроб-

ные клетки можно возвращать в биореактор. Кроме того, пермеат, свободный от клеток, также можно возвращать в биореактор после извлечения продукта, необязательно с добавлением питательных веществ, таких как витамины группы В.

Сукцинат можно выделять из ферментационного бульона с использованием, например, подкисления, электродиализа в сочетании с ионообменной хроматографией (Song, *Enzyme Microb. Technol.*, 39:352-361, 2006), осаждения с помощью Са(ОН) в сочетании с фильтрацией и добавлением серной кислоты (Lee, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 79:11-22, 2008) или реакционной экстракции с экстрагентами на основе аминов, таких как три-*n*-октиламин (Huhet, *Proc. Biochem.* 41:1461-1465, 2006). Для всех способов крайне важно получить кислоту в свободной форме, а не соль. Большинство биотехнологических способов получения янтарной кислоты, однако, работают при нейтральном или слегка кислом рН 6-7. С учетом рКа янтарной кислоты (рКа = 4,16 и 5,61) в этих условиях основная часть янтарной кислоты присутствует в виде соли, а не в виде свободной кислоты. Однако известно, что *C. autoethanogenum* и другие карбокситрофные ацетогены устойчивы и растут при требуемом низком рН 4-6.

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

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

#### Примеры

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

##### Пример 1.

Данный пример описывает основные материалы и способы.

*C. autoethanogenum* DSM10061 и DSM23693 (происходящий из DSM10061) и *C. ljungdahlii* DSM 13528 были получены из DSMZ (Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур, Инхоффенштрассе 7 В, 38124 Брауншвейг, Германия). *C. ragsdalei* ATCC BAA-622 был получен из ATCC (Американской коллекции типовых культур, Манассас, Вирджиния 20108, США). *E. coli* DH5 $\alpha$  был получен от Invitrogen (Карлсбад, Калифорния 92008, США).

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

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

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

## 036071

Компоненты РЕТС среды	Количество на 1 л РЕТС среды
$\text{NH}_4\text{Cl}$	1 г
KCl	0,1 г
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2 г
NaCl	0,8 г
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,1 г
$\text{CaCl}_2$	0,02 г
Раствор микроэлементов (см. ниже)	10 мл
Витаминный раствор Вульфа (см. ниже)	10 мл
Дрожжевой экстракт (необязательно)	1 г
Резазурин (2 г/л биомассы)	0,5 мл
$\text{NaHCO}_3$	2 г
Раствор восстанавливающего агента (см. ниже)	0,006-0,008 % (об./об.)
Фруктоза (для гетеротрофного роста)	5 г

Компоненты раствора микроэлементов	Количество на 1 л раствора микроэлементов
Нитрилтриуксусная кислота	2 г
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1 г
$\text{Fe}(\text{SO}_4)_2(\text{NH}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,8 г
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,2 г
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2 мг
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,02 г
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,02 г
$\text{Na}_2\text{SeO}_3$	0,02 г
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,02 г
$\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,02 г

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

Компоненты раствора восстанавливающего агента	Количество на 100 мл раствора восстанавливающего компонента
NaOH	0,9 г
Цистеин-HCl	4 г
Na <sub>2</sub> S	4 г

Ферментации с *S. autoethanogenum* DSM23693 проводили в 1,5 л биореакторах при 37°C с использованием CO-содержащего газа с металлургического производства в качестве единственного источника энергии и углерода. Готовили среду определенного состава, содержащую MgCl, CaCl<sub>2</sub> (0,5 мМ), KCl (2 мМ), H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (5 мМ), Fe (100 мкМ), Ni, Zn (5 мкМ), Mn, B, W, Mo, Se (2 мкМ). Среду переносили в биореактор и автоклавировали при температуре 121°C в течение 45 мин. После автоклавирования среду дополняли тиамином, пантотенатом (0,05 мг/л) и биотином (0,02 мг/л) и восстанавливали с 3 мМ цистеина HCl. Для достижения анаэробных условий реакционный сосуд продували азотом через фильтр с размером пор 0,2 мкм. Перед инокуляцией газ заменяли на CO-содержащий газ с металлургического производства, непрерывно подавая его в реактор. Поток газа первоначально устанавливали на уровне 80 мл/мин и увеличивали до 200 мл/мин во время середины экспоненциальной фазы, при этом перемешивание увеличивали с 200 до 350 об/мин. Na<sub>2</sub>S дозировано вводили в биореактор в количестве 0,25 мл/ч. После того, как ОП<sub>600</sub> достигала 0,5, биореактор переводили в непрерывный режим со скоростью 1,0 мл/мин (скорость разбавления 0,96 d<sup>-1</sup>). Образцы отбирали для измерения биомассы и метаболитов. Кроме того, на регулярной основе осуществляли парофазный анализ входящего и выходящего газового потока.

Состав газа в паровой фазе измеряли на газовом хроматографе Varian CP-4900 micro GC с двумя установленными каналами. Канал 1 представлял собой десятиметровую молекулярно-ситовую колонку, работающую при температуре 70°C, 200 кПа аргона и временем полуобратной продувки 4,2 с, в то время как канал 2 представлял собой десятиметровую колонку PPQ, работающую при температуре 90°C, 150 кПа гелия и отсутствием полуобратной продувки. Температура инжектора для обоих каналов составляла 70°C. Время анализа устанавливали на 120 с, однако все целевые пики, как правило, элюируются до 100 с. ВЭЖХ-анализ метаболитических конечных продуктов проводили с использованием ВЭЖХ системы Agilent серии 1100, оснащенной RID (рефрактометрическим детектором), работающим при 35°C, и кислотной колонкой Alltech IOA-2000 (150×6,5 мм, размер частиц 5 мкм), термостатируемой при 60°C. В качестве подвижной фазы использовали слегка подкисленную воду (0,005 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) при скорости потока 0,7 мл/мин. Для удаления белков и других клеточных остатков 400 мкл образцов смешивали с 100 мкл 2% (мас./об.) 5-сульфосалициловой кислоты и центрифугировали при 14000×g в течение 3 мин для отделения осажденных остатков. Далее для проведения анализов в ВЭЖХ-хроматограф вводили 10 мкл супернатанта.

ГХ-анализ метаболитических конечных продуктов проводили с использованием газового хроматографа с равновесной паровой фазой Agilent 6890N, оснащенного волокном Supelco PDMS 100 1 см, колонкой Alltech EC-1000 (30 м × 0,25 мм × 0,25 мкм) и пламенно-ионизационным детектором (FID). 5 мл образцов переносили в пробирку Хангейта, нагревали до 40°C на водяной бане и экспонировали на волокне в течение ровно 5 мин. Инжектор выдерживали при 250°C и в качестве газа-носителя использовали

гелий с постоянным расходом 1 мл/мин. Программа термостата составляла 40°C в течение 5 мин с последующим увеличением на 10°C/мин до 200°C. Далее температуру дополнительно увеличивали до 220°C со скоростью 50°C/мин с последующей пятиминутной выдержкой при данной температуре, перед снижением температуры до 40°C со скоростью 50°C/мин и окончательной выдержкой в течение 1 мин. FID выдерживали при 250°C при 40 мл/мин водорода, 450 мл/мин воздуха и 15 мл/мин азота в качестве вспомогательного газа.

Во время эксперимента полной трансформации *S. autoethanogenum* DSM23693 выращивали на среде YTF в присутствии восстанавливающих агентов и отработанного газа с металлургического производства под давлением 30 фунтов /кв. дюйм (собранный на участке New Zealand Steel в Гленбруке, Новая Зеландия, состав: 44% CO, 32% N<sub>2</sub>, 22% CO<sub>2</sub>, 2% H<sub>2</sub>) при температуре 37°C с использованием стандартных анаэробных способов (Hungate, Methods Microbiol., 3B: 17-132, 1969; Wolfe, Adv. Microbiol. Physiol., 6:107-146, 1971).

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

Компоненты раствора восстанавливающего агента	Количество на 100 мл раствора восстанавливающего агента
NaOH	0,9 г
Цистеин-HCl	4 г
Na <sub>2</sub> S	4 г
Дистиллированная вода	до 100 мл

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

*S. autoethanogenum*: Для проверки идентичности шести клонов и переноса ДНК геномную ДНК выделяли из всех 6 колоний/клонов в жидкой среде PETC с применением мини-набора PURELINK™ Genomic DNA (Invitrogen) согласно инструкции производителя. Данные геномные ДНК наряду с диким типом *S. autoethanogenum* DSM23693 использовали в качестве матрицы в ПЦР. ПЦР осуществляли с высокоточной ДНК-полимеразой iproof High Fidelity DNA Polymerase (Bio-Rad Laboratories) со специфическими праймерами, как описано в примерах, приведенных ниже, и по следующей схеме: начальная денатурация при 98°C в течение 2 мин с последующими 25 циклами денатурации (98°C в течение 10 с), ренатурации (61°C в течение 15 с) и элонгации (72°C в течение 90 с) до стадии конечной элонгации (72°C в течение 7 мин). Геномную ДНК из дикого типа *S. autoethanogenum* DSM23693 использовали в качестве матрицы в контрольной ПЦР.

Для подтверждения идентичности клонов также осуществляли ПЦР для 16s рРНК гена с применением праймеров fd1 (SEQ ID NO: 10) и rp2 (SEQ ID NO: 11) и с применением условий ПЦР согласно приведенному выше описанию. Продукты ПЦР очищали с применением набора Zymo CLEAN AND CONCENTRATOR™ и секвенировали с применением праймера rp2.

## Пример 2.

Данный пример демонстрирует генетическую модификацию *C. autoethanogenum* для подавления активности лактатдегидрогеназы. Демонстрацию инактивации идентифицированного (Köpke, Appl. Environ. Microbiol., 77:5467-5475, 2011) гена *Idh* (HQ876025.1) лактатдегидрогеназы (AEI90736.1) в *C. autoethanogenum* продемонстрировали с применением двух методик: гомологичной рекомбинации и ClosTron.

Гомологичная рекомбинация: Для создания штамма *C. autoethanogenum*, более не способного производить лактат, была разработана нокаутующая конструкция для разрушения *Idh* посредством двойной гомологичной рекомбинации. Приблизительно 1 тыс. п.о. гомологичных плеч (SEQ ID NO: 1-2), фланкирующих ген *Idh*, клонировали в плазмиду pMTL85151 (фиг. 1) и результирующую плазмиду pMTL85151-*ldh*-ko (SEQ ID NO: 3). Стандартные методы рекомбинантных ДНК и молекулярного клонирования известны в данной области техники (Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001; Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, Wiley, 1987). Геномную ДНК из *C. autoethanogenum* DSM23693 выделяли с применением набора PureLink от Invitrogen согласно инструкции производителя. Для введения ДНК проводили трансформацию согласно приведенному выше описанию или как описано в WO 2012/053905.

После отбора колонии подвергали скринингу на интеграции одиночного кроссингвера (фиг. 2A) и далее на мутантов двойного кроссингвера (фиг. 2B). Случай кроссингвера 3' отметили в клоне 6 (фиг. 2A) и нокаут гена *Idh* наблюдали при скрининге с внешними фланкирующими праймерами (фиг. 2B). Олигонуклеотиды Og21f (SEQ ID NO: 4), Og24r (SEQ ID NO: 5), Og35f (SEQ ID NO: 6) и Og36r (SEQ ID NO: 7) применяли для идентификации делеции в лактатдегидрогеназе при двойном кроссингвере.

Аналогичную стратегию и плазмиду также можно использовать, например, в *C. ljungdahlii* или *C. gagsdalei*. Протокол трансформации описан в данной области техники (WO 2012/053905 Leang, Applied Environ Microbiol., 79:1102-1109, 2013). ClosTron: ClosTron (Heap, J. Methods Microbiol., 70:452-464, 2007), инструмент конструирования интрона, размещенный на веб-сайте ClosTron, применили для конструирования области-мишени 129s из 344 пар оснований (SEQ ID NO: 8) и идентификации участка-мишени (SEQ ID NO: 9). Область-мишень химически встраивали в вектор pMTL007C-E2, содержащий ретро-транспонированный активированный маркер *ermB* (RAM), при помощи ДНК2.0 (Menlo Park) (SEQ ID NO: 12).

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

Номер последовательности SEQ ID №	Описание
1	левое гомологичное плечо для нарушения гена лактатдегидрогеназы
2	правое гомологичное плечо для нарушения гена лактатдегидрогеназы
3	плазмида pMTL85151-ldh-ko
4	олигонуклеотид Og21f
5	олигонуклеотид Og24r
6	олигонуклеотид Og35f
7	олигонуклеотид Og35f
8	область-мишень ClosTron
9	участок-мишеньClosTron
10	олигонуклеотид fD1
11	олигонуклеотид rP2
12	ClosTron плазмида pMTL007C-E2-ldh::129s

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

Пример 3.

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

Культуры *C. autoethanogenum* и штамма *C. autoethanogenum* с инактивированной лактатдегидрогеназой выращивали на среде PETC с 10 г/л MES буфера в бутылках для сыворотки. Посевной материал составлял 10% от объема среды, и объем среды составлял 10 мл. Культуры насыщали отработанным газом с металлургического производства (44% CO, 22% CO<sub>2</sub>, 2% H<sub>2</sub>, 32% N<sub>2</sub>) под давлением 30 фунтов/кв. дюйм и инкубировали при 37°C. pH среды составлял 5,7. В течение периода роста отбирали образцы для измерения ОП<sub>600</sub> и анализа при помощи ВЭЖХ. Бутылки ежедневно насыщали газом с металлургического производства под давлением 30 фунтов/кв. дюйм. Эксперимент проводили в трех повторностях.

В то время как немодифицированный штамм *C. autoethanogenum* продуцировал 0,263±0,041 г/л лактата после 6 дней роста (фиг. 5A), штамм *C. autoethanogenum* с инактивированной лактатдегидрогеназой не продуцировал лактат после 6 дней роста (фиг. 5B). Кроме того, штамм *C. autoethanogenum* с инактивированной лактатдегидрогеназой продуцировал увеличенное количество ацетата, этанола и 2,3-бутандиола. С другой стороны, два штамма обладали схожими профилями роста и достигали схожей ОП<sub>600 нм</sub>, соответствующей 2,69 и 2,365 соответственно.

Все ссылки, включая публикации, заявки на патент и патенты, процитированные в настоящем описании, включены в настоящий документ посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая ссылка была индивидуально и конкретно была бы включена посредством ссылки и была бы полностью изложена в настоящем описании. Ссылка на любой предшествующий уровень области техники в данном описании не является и не должна быть воспринята как подтверждение того, что предшествующий уровень области техники является составной частью общего знания в области деятельности в любой стране. Использование терминов "форм единственного числа" и других похожих ссылок в контексте описания настоящего изобретения (особенно в контексте последующей формулы изобретения) должно толковаться как охватывающее как единственное, так и множественное число, если в настоящем описании не указано иное или явно не противоречит контексту. Термины "содержащий", "имеющий", "включающий в себя" и "содержащий" следует истолковывать как открытые термины (т.е. означающие "включающий, но не ограничивающийся этим"), если не указано иное. Указание диапазонов значений в настоящем описании всего лишь предназначено для использования в качестве условно-сокращенного способа ссылки индивидуально на каждую отдельную величину, лежащую внутри диапазона, если в контексте не указано иное, и каждое отдельное значение включено в описание, как если бы оно было индивидуально указано в на-

стоящем документе. Все описанные способы могут быть выполнены в любом подходящем порядке, если не указано иное или иное явно противоречит контексту. Применение любого и всех примеров или иллюстрирующих слов (например, "такой как"), предложенных в настоящем описании, предназначено только для лучшего освещения изобретения и не накладывает ограничений на объем изобретения, если не заявлено иное. Ни одно из иллюстрирующих слов в описании не должно быть истолковано как указание на какой-либо незаявленный элемент в качестве существенного для практического осуществления изобретения. Предпочтительные варианты реализации настоящего изобретения описаны в настоящем документе, включая наилучший способ, известный изобретателям, для осуществления изобретения. Варианты данных предпочтительных вариантов реализации могут стать очевидными для специалистов в данной области техники после прочтения приведенного выше описания. Авторы изобретения ожидают, что квалифицированные специалисты реализуют такие подходящие варианты, и авторы изобретения предполагают, что изобретение возможно осуществить на практике иным способом, нежели чем конкретно описано в настоящем документе. Соответственно, данное изобретение включает все модификации и эквиваленты объекта изобретения, изложенного в формуле изобретения, прилагаемой к настоящему документу, в соответствии с действующим законодательством. Более того, любое сочетание вышеописанных элементов во всех их возможных вариантах охватывается изобретением, если не указано иное или иным образом явно не противоречит контексту.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Карбокситрофная ацетогенная бактерия, содержащая нарушающую мутацию в гене, кодирующем фермент лактатдегидрогеназу, причем нарушающая мутация уменьшает или устраняет экспрессию или активность фермента лактатдегидрогеназы, отличающаяся тем, что бактерия представляет собой *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* или *Clostridium ragsdalei*.

2. Бактерия по п.1, отличающаяся тем, что указанная бактерия продуцирует уменьшенное количество лактата по сравнению с бактерией дикого типа.

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

4. Бактерия по п.1, отличающаяся тем, что указанная бактерия продуцирует одно или несколько из следующих веществ: этанол, 2,3-бутандиол, формиат, пируват, сукцинат, валин, лейцин, изолейцин, малат, фумарат, 2-оксоглутарат, цитрат и цитрамалат.

5. Бактерия по п.1, отличающаяся тем, что указанная бактерия продуцирует увеличенное по сравнению с бактерией дикого типа количество одного или нескольких из следующих веществ: этанол, 2,3-бутандиол, формиат, пируват, сукцинат, валин, лейцин, изолейцин, малат, фумарат, 2-оксоглутарат, цитрат и цитрамалат.

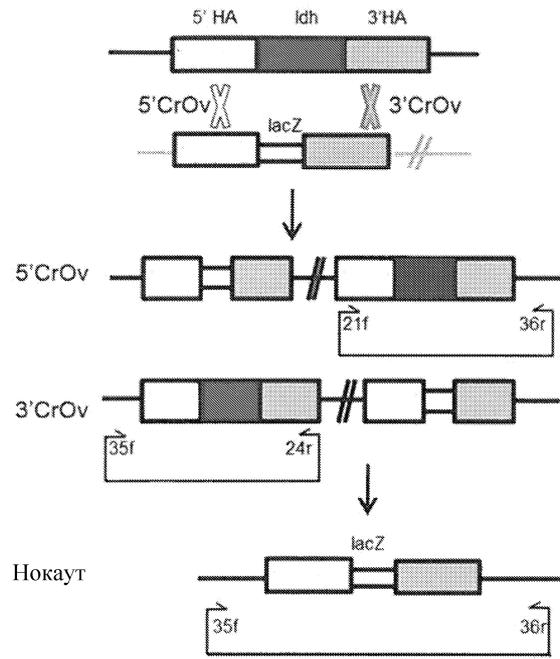
6. Бактерия по п.1, отличающаяся тем, что указанная бактерия представляет собой *Clostridium autoethanogenum* DSM23693.

7. Способ получения продукта, выбранного из этанола, 2,3-бутандиола, формиата, пирувата, сукцината, валина, лейцина, изолейцина, малата, фумарата, 2-оксоглутарата, цитрата и цитрамалата, при культивировании бактерии по п.1 в присутствии субстрата, содержащего CO.

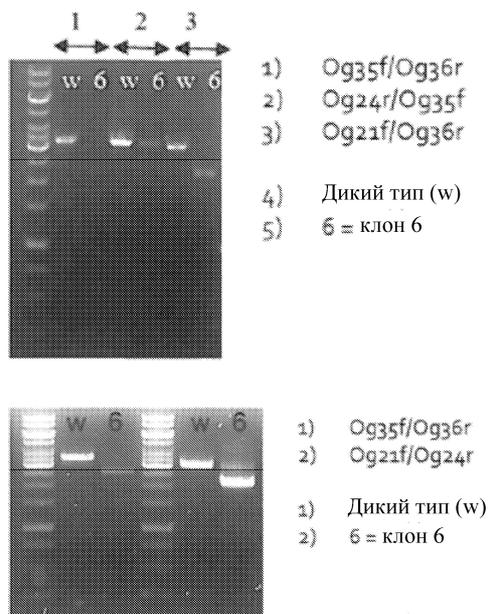
8. Способ по п.7, отличающийся тем, что указанная бактерия продуцирует уменьшенное количество лактата по сравнению с бактерией дикого типа.

9. Способ по п.7, отличающийся тем, что указанная бактерия не продуцирует лактат.

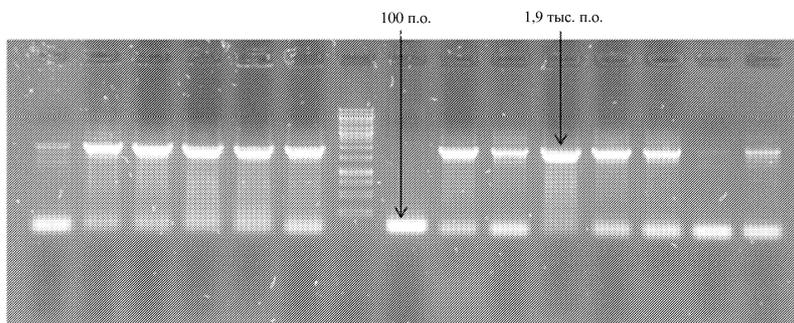
10. Способ по п.7, отличающийся тем, что указанная бактерия продуцирует увеличенное количество указанного продукта по сравнению с бактерией дикого типа.



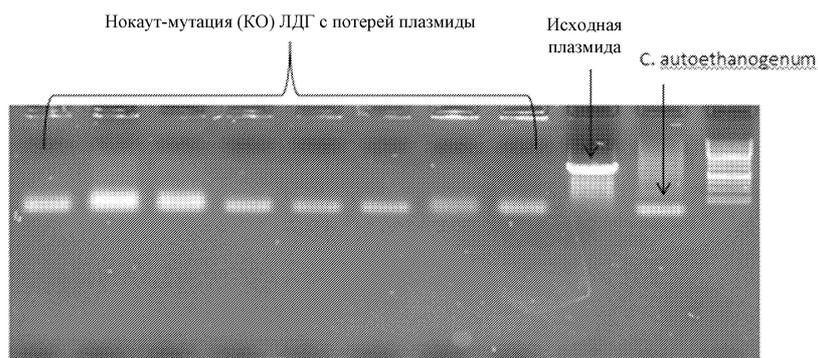
Фиг. 1



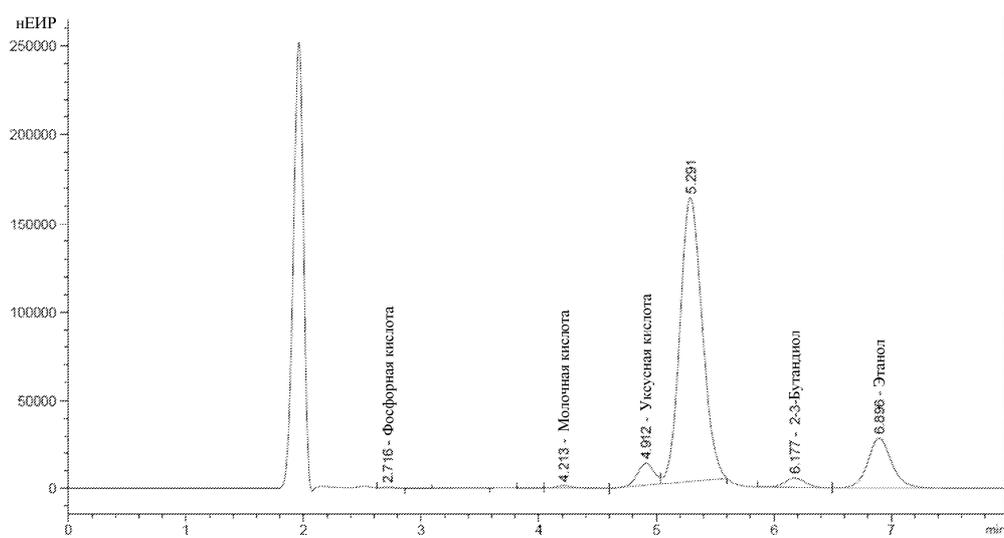
Фиг. 2



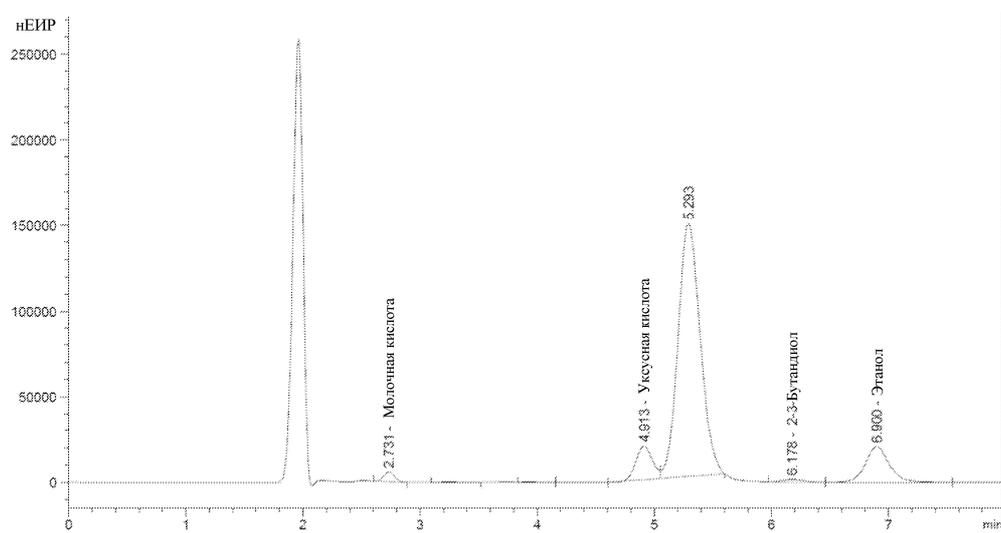
Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5А



Фиг. 5В

