

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202090887 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.07.03(22) Дата подачи заявки
2018.10.04(51) Int. Cl. C12N 15/74 (2006.01)
C12N 9/04 (2006.01)
C12N 9/10 (2006.01)
C12P 7/62 (2006.01)

(54) ПОЛУЧЕНИЕ ПОЛИГИДРОКСИБУТИРАТА В МИКРООРГАНИЗМЕ ВУДА-ЛЬЮНГДАЛЯ

(31) 62/568,127

(32) 2017.10.04

(33) US

(86) PCT/US2018/054473

(87) WO 2019/071052 2019.04.11

(88) 2019.05.31

(71) Заявитель:
ЛАНЦАТЕК, ИНК. (US)

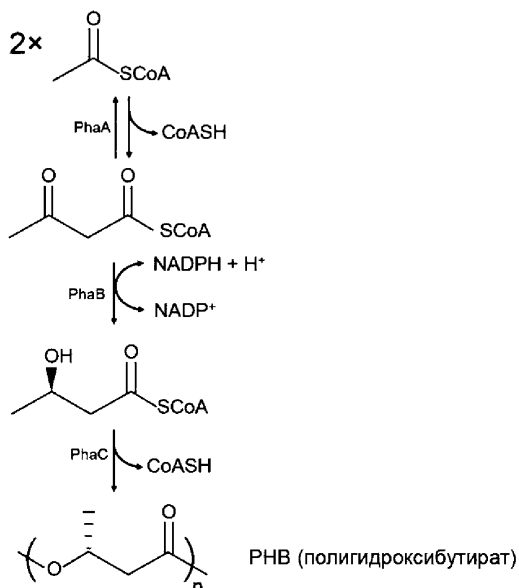
(72) Изобретатель:

Тэппел Райан Кристофер,
Берендорфф Джеймс Брюс Ярнтон
Хэйкок, Кёпке Михель, Марселлин
Эстебан, Лемгрубер Ренато Де Соуза
Пинту, Вальгепея Каспар, Нильсен
Ларс (US)

(74) Представитель:

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

(57) В данном изобретении предлагаются микроорганизмы и способы получения полигидроксибутирата (PHB) из газообразных субстратов. В частности, в данном изобретении предлагается не встречающийся в природе микроорганизм Вуда-Льюнгдала, содержащий (а) фермент, который преобразует ацетил-КоА в ацетоацетил-КоА, (б) фермент, который преобразует ацетоацетил-КоА в 3-гидроксибутирил-КоА, и (с) фермент, который преобразует 3-гидроксибутирил-КоА в полигидроксибутират, а также связанные с этим способы.



A1

202090887

202090887

A1

ПОЛУЧЕНИЕ ПОЛИГИДРОКСИБУТИРАТА В МИКРООРГАНИЗМЕ ВУДА-ЛЬЮНГДАЛЯ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННУЮ ЗАЯВКУ

1 В данной заявке испрашивается приоритет по заявке на патент США 62/568127, поданной 4 октября 2017 г., которая включена в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

2 Данное изобретение относится к генетически модифицированным микроорганизмам и способам получения полигидроксибутирата (PHB) посредством микробиологической ферментации, в частности, посредством микробиологической ферментации газообразного субстрата.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

3 Полимерные материалы, получаемые из нефти, стали жизненно необходимыми в современной жизни, преимущественно благодаря их легкости, прочности, долговечности и устойчивости к разложению. Однако, зависимость от полимерных материалов, получаемых из нефти, привела к множеству серьезных проблем, включая истощение запасов сырой нефти, загрязнение и накопление на свалках. Для уменьшения воздействия полимерных материалов на окружающую среду предпринимаются усилия по замене обычных полимерных материалов, получаемых из нефти, на биополимеры, например, полилактид, полисахариды, алифатические полиэфиры и полигидроксиалканоаты, которые имеют физико-химические свойства, аналогичные свойствам обычных пластмасс (Anjum, *Int J Biol Macromol*, 89: 161-174, 2016). Однако, микроорганизмы и способы получения таких биополимеров, практически, все еще не разработаны.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

4 В данном изобретении предлагается генетически модифицированный микроорганизм, способный продуцировать PHB. В частности, в данном изобретении предлагается не встречающийся в природе микроорганизм Вуда-Льюнгдаля,

содержащий (а) фермент, который преобразует ацетил-КоА в ацетоацетил-КоА, (б) фермент, который преобразует ацетоацетил-КоА в 3-гидроксibuтирил-КоА, и (с) фермент, который преобразует 3-гидроксibuтирил-КоА в РНВ.

5 В одном варианте осуществления изобретения фермент, который преобразует ацетил-КоА в ацетоацетил-КоА, представляет собой ацетил-КоА-С-ацетилтрансферазу (ЕС 2.3.1.9). Например, ацетил-КоА-С-ацетилтрансфераза может быть получена из *Acinetobacter baumannii*, *Aeromonas hydrophilia*, *Alcaligenes latus*, *Arthrosira platensis*, *Bacillus subtilis*, *Burkholderia cepacia*, *Clostridium acetobutylicum*, *Cupriavidus necator*, *Escherichia coli*, *Haloferax mediterranei*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mandelii*, *Pseudomonas oleovorans*, *Pseudomonas putida* или *Streptomyces coelicolor*.

6 В одном варианте осуществления изобретения фермент, который преобразует ацетоацетил-КоА в 3-гидроксibuтирил-КоА, представляет собой ацетоацетил-КоА-редуктазу (ЕС 1.1.1.36) или 3-гидроксibuтирил-КоА-дегидрогеназу (ЕС 1.1.1.157). Например, ацетоацетил-КоА-редуктаза может быть получена из *Acinetobacter baumannii*, *Aeromonas hydrophilia*, *Alcaligenes latus*, *Arthrosira platensis*, *Bacillus subtilis*, *Burkholderia cepacia*, *Cupriavidus necator*, *Haloferax mediterranei*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mandelii*, *Pseudomonas oleovorans*, *Pseudomonas putida* или *Streptomyces coelicolor*. В другом примере 3-гидроксibuтирил-КоА-дегидрогеназа может быть получена из *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium acetobutylicum* или *Clostridium kluyveri*.

7 В одном варианте осуществления изобретения фермент, который преобразует 3-гидроксibuтирил-КоА в полигидроксibuтират, представляет собой полигидроксibuтират-синтазу (ЕС 2.3.1.-). Например, полигидроксibuтират-синтаза может быть получена из *Acinetobacter baumannii*, *Aeromonas caviae*, *Aeromonas hydrophilia*, *Alcaligenes latus*, *Arthrosira platensis*, *Bacillus subtilis*, *Burkholderia cepacia*, *Cupriavidus necator*, *Haloferax mediterranei*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mandelii*, *Pseudomonas oleovorans*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas* sp. 61-3, *Rhodospirillum rubrum* или *Streptomyces coelicolor*.

8 В одном варианте осуществления изобретения микроорганизм является представителем рода, выбранного из группы, состоящей из: *Acetobacterium*, *Alkalibaculum*, *Blautia*, *Butyribacterium*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Moorella*, *Oxobacter*,

Sporomusa и *Thermoanaerobacter*. Например, микроорганизм может быть получен из родительского микроорганизма, выбранного из группы, состоящей из: *Acetobacterium woodii*, *Alkalibaculum bacchii*, *Blautia producta*, *Butyribacterium methylotrophicum*, *Clostridium aceticum*, *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium carboxidivorans*, *Clostridium coskatii*, *Clostridium drakei*, *Clostridium formicoaceticum*, *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium magnum*, *Clostridium ragsdalei*, *Clostridium scatologenes*, *Eubacterium limosum*, *Moorella thermautotrophica*, *Moorella thermoacetica*, *Oxobacter pfennigii*, *Sporomusa ovata*, *Sporomusa silvacetica*, *Sporomusa sphaeroides* и *Thermoanaerobacter kiuvi*. В предпочтительном варианте осуществления изобретения микроорганизм получен из родительской бактерии, выбранной из группы, состоящей из: *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium coskatii*, *Clostridium ljungdahlii* и *Clostridium ragsdalei*.

9 В одном варианте осуществления изобретения микроорганизм потребляет газообразные субстраты, содержащие один или большее количество из: CO, CO₂ и H₂. В другом варианте осуществления изобретения микроорганизм является анаэробным. В еще одном варианте осуществления изобретения микроорганизм не способен разлагать РНВ.

10 В данном изобретении также предлагается способ получения РНВ, включающий в себя культивирование микроорганизма по изобретению в присутствии газообразного субстрата. Например, газообразный субстрат может содержать один или большее количество из: CO, CO₂ и H₂. В одном варианте осуществления изобретения культивирование проводят в анаэробных условиях. В другом варианте осуществления изобретения культивирование проводят в отсутствие углеводных субстратов. В еще одном варианте осуществления изобретения культивирование проводят в отсутствие света.

11 Эти и другие особенности и преимущества данного изобретения будут более понятны из нижеизложенного подробного описания, рассматриваемого в совокупности с прилагаемой формулой изобретения. Следует отметить, что объем формулы изобретения определяется приведенными в ней формулировками, а не конкретным рассмотрением признаков и преимуществ, изложенных в данном описании.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

12 На Фиг. 1 проиллюстрирована диаграмма, на которой изображен ферментативный путь получения полигидроксibuтирата (PHB).

13 На Фиг. 2 проиллюстрирована карта плазмиды pPHB_01.

14 На Фиг. 3 проиллюстрирован график, на котором изображено продуцирование PHB в *C. autoethanogenum*, несущем плазмиду путем биосинтеза PHB (pPHB_01) либо пустую плазмиду (pMTL83157) в качестве отрицательного контроля. Бактерии вырастили анаэробно в бутылках с повышенным давлением, в которых источником углерода являлись только CO и CO₂. Выход PHB (выраженный в % мас. сухой клеточной массы (СКМ)) определили методом ВЭЖХ. Значения представляют собой средние значения биологических триплетов плюс или минус стандартные отклонения относительно этих средних значений. PHB не был обнаружен в образцах, содержащих плазмиду pMTL83157 (пустую).

15 На Фиг. 4А-4D проиллюстрированы графики, на которых изображен рост *C. autoethanogenum* при различных условиях роста. Бактерии содержали пустую плазмиду (pMTL83157) либо плазмиду, содержащую путь синтеза PHB (pPHB_01). На каждом графике проиллюстрирован различный набор условий. На Фиг. 4А (условие 1) проиллюстрировано повторение условий, применяемых для получения данных, наблюдаемых на Фиг. 3, с использованием газовой смеси, содержащей 50/18/3/29 CO/CO₂/H₂/N₂ в качестве единственного источника углерода. На Фиг. 4В (условие 2) проиллюстрированы идентичные условию 1 условия, но с новым газовым субстратом (50/30/10/10 CO/CO₂/H₂/N₂). На Фиг. 4С (условие 3) проиллюстрированы идентичные условию 2 условия, но с продленным временем инкубации. На Фиг. 4D (условие 4) проиллюстрированы идентичные условию 3 условия, но с периодическим обновлением газового субстрата. Значения представляют собой средние значения биологических триплетов плюс или минус стандартные отклонения относительно этих средних значений.

16 На Фиг. 5 проиллюстрирован график, на котором изображено продуцирование PHB в *C. autoethanogenum* в условиях 1-4, как описано совместно с Фиг. 4А-4D. Значения представляют собой средние значения биологических триплетов плюс или

минус стандартные отклонения относительно этих средних значений. РНВ не был обнаружен в образцах, содержащих плазмиду pMTL83157 (пустую).

17 На Фиг. 6 проиллюстрирован график, на котором изображено продуцирование РНВ в *C. autoethanogenum* из газообразных источников углерода при непрерывной ферментации. Бактерии конъюгировали с плазмидой pРНВ_01, содержащей путь синтеза РНВ. При завершении ферментации измерили РНВ. Газовые субстраты содержали 20% водорода либо 2% водорода в составе их смесей из 50/20/20/10 CO/CO₂/H₂/Ar или 50/20/2/28 CO/CO₂/H₂/N₂, соответственно. pH поддерживали на уровне 5. Значения представляют собой средние значения в точности воспроизведенных ферментаций плюс или минус стандартные отклонения относительно этих средних значений.

18 На Фиг.7 проиллюстрирован график, на котором изображено усиление продуцирования РНВ в *C. autoethanogenum* из источников газообразного углерода при непрерывной ферментации. Бактерии конъюгировали с плазмидой pРНВ_01, содержащей путь синтеза РНВ. При завершении ферментации измерили РНВ. Газовые субстраты содержали 20% водорода либо 2% водорода в составе их смесей из 50/20/20/10 CO/CO₂/H₂/Ar или 50/20/2/28 CO/CO₂/H₂/N₂, соответственно. 20% водорода, низкая биомасса имела пониженную концентрацию биомассы по сравнению с другими циклами. 20% водорода, изменение pH начиналось с pH 6, а затем снизилось до 5,5. 20% водорода, pH 6 поддерживали в течение всего цикла ферментации, пока культуры не уменьшились. Значения представляют собой средние значения в точности воспроизведенных ферментаций плюс или минус стандартные отклонения относительно этих средних значений.

19 На Фиг.8 проиллюстрирован график, на котором изображены значения РНВ для моделирования с использованием реконструкций метаболической модели в масштабе генома (GEM). Экспериментально обнаруженный РНВ сравнивали с уровнями РНВ, предсказанными GEM, с использованием максимизации выхода РНВ. Максимизация выхода РНВ также была испытана с поглощением 2 ммоль/гСКМ/ч любого из: NADH (восстановленного никотинамидадениндинуклеотида), NADPH (восстановленного никотинамидадениндинуклеотидфосфата), Fd_{red} (восстановленного ферредоксина) или АТР (аденозинтрифосфата). Испытанными условиями были РНВ20 (контроль); РНВLowB (низкая биомасса) и РНВpH5,5 (pH 5,5). Было установлено, что АТР

ограничивает PHB наиболее (было достигнуто наивысшее значение PHB), за ним следует Fd_{red} , NADPH и затем NADH. Данные представляют собой среднее значение $\pm$ стандартное отклонение двух биологических повторов хемостатов.

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

20 Уже давно обнаружено, что каталитические процессы, например, процесс Фишера-Тропша, могут быть использованы для преобразования газов, содержащих диоксид углерода (CO_2), монооксид углерода (CO) и/или водород (H_2), например, промышленного отработанного газа или синтез-газа, в разнообразные топлива и химреагенты. Однако, в последнее время ферментация газа стала альтернативной платформой для биологической фиксации углерода таких газов. В частности, было продемонстрировано, что ацетогенные микроорганизмы (т.е. Вуда-Льюнгдаля) преобразуют газы, содержащие CO, CO_2 и/или H_2 в продукцию, например, этанол и 2,3-бутандиол. Целесообразность получения более сложных полимерных молекул, например, PHB, из этих газов является хорошо обоснованной (Drzyzga, *J Chem Technol Biotechnol*, 90: 1735-1751, 2015). Однако, путь Вуда-Льюнгдаля работает на термодинамической границе жизни (Schuchmann, *Nat Rev Microbiol*, 12: 809-821, 2014), что затрудняет накопление микроорганизмами Вуда-Льюнгдаля достаточного количества углерода даже для роста и поддержания клеток, продуцируется гораздо меньше сложных углеродных продуктов. Эти метаболические проблемы усугубляются плохим растворением газообразных субстратов (например, CO, CO_2 и/или H_2) в ферментационных средах по сравнению с углеводными или сахарными субстратами. Поэтому представляется маловероятным, что микроорганизмы Вуда-Льюнгдаля могут быть сконструированы с возможностью синтеза PHB или других полигидроксиалканоатов, тем более, что эти полимеры изначально продуцируются такими видами, как *Rhodospirillum rubrum* и *Cupriavidus necator* в качестве средств для хранения избытка углерода. Действительно, на сегодняшний день попытки создать ацетогенные микроорганизмы для получения PHB из CO_2 и/или H_2 были безуспешными (европейский проект SYNPOL, биополимеры из брожения синтез-газа, 2012-2017).

21 Однако, после кропотливых исследований и инженерных разработок авторы изобретения достигли первого в мире синтеза PHB в микроорганизмах Вуда-

Льюнгдаля. Это является важной вехой на пути к получению возобновляемых и устойчивых биополимеров.

22 В первом аспекте, в данном изобретении предлагается микроорганизм Вуда-Льюнгдаля, способный продуцировать РНВ. Во втором аспекте, в данном изобретении предлагается способ получения РНВ посредством культивирования вышеупомянутого микроорганизма Вуда-Льюнгдаля в присутствии газообразного субстрата.

Путь

23 Поскольку микроорганизмы Вуда-Льюнгдаля нативно не продуцируют РНВ, получение РНВ в микроорганизме Вуда-Льюнгдаля требует введения по меньшей мере одного гетерологичного фермента. Микроорганизм по изобретению, как правило, содержит три гетерологичных фермента, а именно: (а) фермент, который преобразует ацетил-КоА в ацетоацетил-КоА, (b) фермент, который преобразует ацетоацетил-КоА в 3-гидроксibuтирил-КоА, и (с) фермент, который преобразует 3-гидроксibuтирил-КоА в полигидроксibuтират. Этот путь проиллюстрирован на Фиг. 1.

24 (1) Преобразование ацетил-КоА в ацетоацетил-КоА

25 Преобразование ацетил-КоА в ацетоацетил-КоА может быть катализировано любым подходящим ферментом. Хотя возможно, что нативная активность для этой реакции может присутствовать в некоторых ацетогенных бактериях, как правило, необходимо вводить гетерологичный (т.е. не нативный) фермент, чтобы катализировать эту реакцию. В предпочтительном варианте осуществления изобретения фермент представляет собой ацетил-КоА-С-ацетилтрансферазу (также известную как тиолазу или 3-кетотиолазу), которая имеет активность, определяемую ЕС 2.3.1.9 (т.е. $2\text{-ацетил-КоА} \leftrightarrow \text{КоА} + \text{ацетоацетил-КоА}$). Ацетил-КоА-С-ацетилтрансфераза может быть получена из любого подходящего микроорганизма-хозяина, например, *Acinetobacter baumannii*, *Aeromonas hydrophilia*, *Alcaligenes latus*, *Arthrosira platensis*, *Bacillus subtilis*, *Burkholderia cepacia*, *Clostridium acetobutylicum*, *Cupriavidus necator*, *Escherichia coli*, *Haloferax mediterranei*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mandelii*, *Pseudomonas oleovorans*, *Pseudomonas putida* или *Streptomyces coelicolor*.

26 В частности, ацетил-КоА-С-ацетилтрансфераза может представлять собой или может быть получена из *Acinetobacter baumannii* PhaA (SCZ16966), *Aeromonas hydrophilia* PhaA (WP_043162470), *Alcaligenes latus* PhaA (AAC83659), *Arthrosira platensis* PhaA (WP_006617472), *Bacillus subtilis* PhaA (CUB52080), *Burkholderia cepacia*

PhaA (WP_043187452), *Clostridium acetobutylicum* ThlA (WP_0109661571), *Cupriavidus necator* PhaA (WP_013956452.1), *Cupriavidus necator* BktB (WP_011615089.1), *Cupriavidus necator* phaA (WP_010810132.1), *Escherichia coli* AtoB (NP_416728.1), *Haloferax mediterranei* PhaA (WP_004059344), *Pseudomonas aeruginosa* PhaA (WP_038823536), *Pseudomonas fluorescens* PhaA (WP_073525707), *Pseudomonas mandelii* PhaA (WP_019582144), *Pseudomonas oleovorans* PhaA (WP_074859314), *Pseudomonas putida* PhaA (WP_058540218) или *Streptomyces coelicolor* PhaA (WP_011030221).

27 (2) Преобразование ацетоацетил-КоА в 3-гидроксibuтирил-КоА

28 Преобразование ацетоацетил-КоА в 3-гидроксibuтирил-КоА может быть катализировано любым подходящим ферментом. Хотя возможно, что нативная активность для этой реакции может присутствовать в некоторых ацетогенных бактериях, как правило, необходимо вводить гетерологичный (т.е. не нативный) фермент, чтобы катализировать эту реакцию. В предпочтительном варианте осуществления изобретения фермент представляет собой ацетоацетил-КоА-редуктазу, которая обладает активностью, определяемой EC 1.1.1.36 (т.е. (R)-3-гидроксиацил-КоА + NADP⁺ ↔ 3-оксоацил-КоА + NADPH + H⁺). Ацетоацетил-КоА-редуктаза может быть получена из любого подходящего микроорганизма-хозяина, например, *Acinetobacter baumannii*, *Aeromonas hydrophilia*, *Alcaligenes latus*, *Arthrosira platensis*, *Bacillus subtilis*, *Burkholderia cepacia*, *Cupriavidus necator*, *Haloferax mediterranei*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mandelii*, *Pseudomonas oleovorans*, *Pseudomonas putida* или *Streptomyces coelicolor*. В частности, ацетоацетил-КоА-редуктаза может представлять собой *Acinetobacter baumannii* PhaB (WP_095389464), *Aeromonas hydrophilia* PhaB (WP_041216919), *Alcaligenes latus* PhaB (AAC83660), *Arthrosira platensis* PhaB (WP_043469113), *Bacillus subtilis* PhaB (WP_070548955), *Burkholderia cepacia* PhaB (WP_059234032), *Cupriavidus necator* PhaB (WP_010810131.1), *Haloferax mediterranei* PhaB (WP_004572392), *Pseudomonas aeruginosa* PhaB (WP_031690879), *Pseudomonas fluorescens* PhaB (WP_030141425), *Pseudomonas mandelii* PhaB (WP_094467462), *Pseudomonas oleovorans* PhaB (WP_074858624), *Pseudomonas putida* PhaB (BAB96554) или *Streptomyces coelicolor* PhaB (WP_011027734). В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения фермент представляет собой 3-гидроксibuтирил-КоА-дегидрогеназу, которая имеет активность, определяемую EC 1.1.1.157 (т.е. (S)-3-гидроксibuтаноил-

$\text{CoA} + \text{NADP}^+ = 3\text{-ацетоацетил-CoA} + \text{NADPH} + \text{H}^+$). 3-гидроксибутирил-CoA-дегидрогеназа может представлять собой или может быть получена из любого подходящего микроорганизма-хозяина, например, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium acetobutylicum* или *Clostridium kluyveri*. В частности, 3-гидроксибутирил-CoA-дегидрогеназа может представлять собой *Clostridium beijerinckii* Hbd (WP_011967675.1), *Clostridium acetobutylicum* Hbd (NP_349314.1) или *Clostridium kluyveri* Hbd1 (WP_011989027.1).

29 Предпочтительно, фермент, который преобразует ацетоацетил-CoA в 3-гидроксибутирил-CoA, является (R)-специфическим, т.е. продуцирует (R)-3-гидроксибутирил-CoA, так как (R)-3-гидроксибутирил-CoA является типичным субстратом для ферментативного продуцирования PHB. Однако, в некоторых случаях, фермент, который преобразует ацетоацетил-CoA в 3-гидроксибутирил-CoA, является (S)-специфическим, т.е. продуцирует (S)-3-гидроксибутирил-CoA. Не желая быть связанными какой-либо конкретной теорией, авторы изобретения полагают, что нативная или введенная эпимеразная активность в ацетогенной бактерии может позволить взаимопреобразования (S)- и (R)-3-гидроксибутирил-CoA, например, (S)-3-гидроксибутирил-CoA может быть преобразован в (R)-3-гидроксибутирил-CoA, который затем может быть преобразован в PHB.

30 (3) Преобразование 3-гидроксибутирил-CoA в PHB

31 Преобразование 3-гидроксибутирил-CoA в PHB может быть катализировано любым подходящим ферментом. Хотя возможно, что нативная активность для этой реакции может присутствовать в некоторых ацетогенных бактериях, как правило, необходимо вводить гетерологичный (т.е. не нативный) фермент, чтобы катализировать эту реакцию. В предпочтительном варианте осуществления изобретения фермент представляет собой полигидроксиалканоат-синтазу, которая обладает активностью, определяемой ЕС 2.3.1.-, например, ЕС 2.3.1.B2 (тип I) (т.е. 3-гидроксибутирил-CoA + [(R)-3-гидроксибутаноат]_n = [(R)-3-гидроксибутаноат]_{n+1} + CoA), ЕС 2.3.1.B3 (тип II) (т.е. 3-гидроксиацил-CoA + [(R)-3-гидроксиацил]_n = [(R)-3-гидроксиацил]_{n+1} + CoA) или ЕС 2.3.1.B4 (тип III) (т.е. 3-гидроксиацил-CoA + [(R)-3-гидроксиацил]_n = [(R)-3-гидроксиацил]_{n+1} + CoA). Этот фермент также может упоминаться как полигидроксиалканоат-полимераза, полигидроксибутират-синтаза, полигидроксибутират-полимераза и аналогичными терминами. Полигидроксиалканоат-синтаза может быть получена из любого подходящего

микроорганизма-хозяина, например, *Acinetobacter baumannii*, *Aeromonas caviae*, *Aeromonas hydrophilia*, *Alcaligenes latus*, *Arthrosira platensis*, *Bacillus subtilis*, *Burkholderia cepacia*, *Cupriavidus necator*, *Haloferax mediterranei*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mandelii*, *Pseudomonas oleovorans*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas* sp. 61-3, *Rhodospirillum rubrum* или *Streptomyces coelicolor*. В частности, полигидроксикапроат-синтаза может представлять собой или может быть получена из *Acinetobacter baumannii* PhaC (SCY71072), *Aeromonas caviae* PhaC (WP_045524574), *Aeromonas hydrophilia* PhaC1 (WP_017780191) или PhaC2 (AAV41872), *Alcaligenes latus* PhaC (WP_084267317), *Arthrosira platensis* PhaC (WP_006617456), *Bacillus subtilis* PhaC (CUB58881), *Burkholderia cepacia* PhaC (WP_027784567), *Cupriavidus necator* PhaC (WP_011615085 или WP_013956451.1), *Haloferax mediterranei* PhaC (WP_004056138), *Pseudomonas aeruginosa* PhaC1 (WP_038823539) или PhaC2 (WP_025271419), *Pseudomonas fluorescens* PhaC1 (WP_057399292) or PhaC2 (WP_030141001), *Pseudomonas mandelii* PhaC1 (WP_094467460) или PhaC2 (WP_010465951), *Pseudomonas oleovorans* PhaC1 (AAL17611) или PhaC2 (WP_037049875), *Pseudomonas putida* PhaC1 (BAB96552) или PhaC2 (WP_029886362), *Pseudomonas* sp. 61-3 PhaC1 (BAA36198) или PhaC2 (BAA36202), *Rhodospirillum rubrum* PhaC1 (WP_011388028), PhaC2 (WP_011390166), или PhaC3 (WP_011398569), или *Streptomyces coelicolor* PhaC.

32 В некоторых вариантах осуществления изобретения одна или большее количество деструктивных мутаций могут быть введены в один или большее количество эндогенных ферментов для уменьшения или устранения конкуренции с введенными гетерологичными ферментами. В частности, «деструктивная мутация» представляет собой мутацию, которая уменьшает или устраняет (т.е., «разрушает») экспрессию или активность гена или фермента. Деструктивная мутация может частично деактивировать, полностью деактивировать или удалить ген или фермент. Деструктивная мутация может представлять собой нокаутную (КО) мутацию. Деструктивная мутация может представлять собой любую мутацию, которая снижает, предотвращает или блокирует биосинтез продукта, продуцируемого ферментом. Деструктивная мутация может включать в себя, например, мутацию в гене, кодирующем фермент, мутацию в генетическом регуляторном элементе, участвующем в экспрессии гена, кодирующего фермент, введение нуклеиновой кислоты, которая продуцирует белок, который уменьшает или ингибирует активность фермента, или введение нуклеиновой кислоты (например, антисмысловой РНК, миРНК,

направляющей РНК) и/или белка (например, белка Cas), который ингибирует экспрессию фермента. Деструктивная мутация может быть введена с использованием любого способа, известного в данной области техники.

33 Например, микроорганизм по изобретению может иметь деструктивную мутацию в эндогенном ферменте тиюэстеразе. У *Clostridium autoethanogenum* были идентифицированы три предполагаемые *тиуюэстеразы*: (1) «тиуюэстераза 1» (AGY74947.1; аннотирована как пальмитоил-КоА-гидролаза), (2) «тиуюэстераза 2» (AGY75747.1; аннотирована как 4-гидроксibenзоил-КоА-тиуюэстераза) и (3) «тиуюэстераза 3» (AGY75999.1; аннотирована как предполагаемая тиюэстераза). У *Clostridium ljungdahlii* были также идентифицированы три предполагаемые *тиуюэстеразы*: (1) «тиуюэстераза 1» (ADK15695.1; аннотирована как предсказанная ацил-КоА-тиуюэстераза 1), (2) «тиуюэстераза 2» (ADK16655.1; аннотирована как предсказанная тиюэстераза) и (3) «тиуюэстераза 3» (ADK16959.1; аннотирована как предсказанная тиюэстераза). Деструктивная мутация может влиять на любую из этих тиюэстераз или любые другие тиюэстеразы, которые могут быть эндогенными для микроорганизма по изобретению.

Микроорганизм

34 «Микроорганизм» представляет собой микроскопический организм, в частности, бактерию, архею, вирус или грибок. Микроорганизм по данному изобретению, как правило, представляет собой бактерию. В контексте данного изобретения следует считать, что термин «микроорганизм» включает в себя термин «бактерия».

35 Микроорганизм по изобретению не встречается в природе. Подразумевается, что термин «не встречающийся в природе» при применении в отношении микроорганизма означает, что указанный микроорганизм имеет по меньшей мере одну генетическую модификацию, не встречающуюся в природном штамме перечисленных видов, в том числе в штаммах дикого типа перечисленных видов. Не встречающиеся в природе микроорганизмы, как правило, разрабатывают в лаборатории или исследовательском центре. В отличие от этого, термин «дикий тип» относится к типичной форме организма, штамма, гена или характеристики, в какой они встречаются в природе.

36 Термины «генетическая модификация», «генетическое изменение» или «генная инженерия» в широком смысле относятся к манипулированию геномом или

нуклеиновыми кислотами микроорганизма руками человека. Аналогичным образом, термины «генетически модифицированный», «генетически измененный» или «генетически сконструированный» относятся к микроорганизму, содержащему такую генетическую модификацию, генетическое изменение или генетическое конструирование. Эти термины могут быть использованы для разграничения созданного в лаборатории микроорганизма от встречающегося в природе микроорганизма. Способы генетической модификации включают в себя, например, экспрессию гетерологичного гена, вставку или делецию гена или промотора, мутацию нуклеиновой кислоты, экспрессию или инактивацию измененного гена, ферментную инженерию, направленное развитие, конструирование на основе знаний, способы случайного мутагенеза, генную перетасовку и оптимизацию кодонов.

37 «Рекомбинантный» означает, что нуклеиновая кислота, белок или микроорганизм является продуктом генетической модификации, инженерии или рекомбинации. В целом, термин «рекомбинантный» относится к нуклеиновой кислоте, белку или микроорганизму, который содержит или кодируется генетическим материалом, полученным из нескольких источников, например, двух или большего количества разных штаммов или видов микроорганизмов. Микроорганизм по данному изобретению, как правило, является рекомбинантным.

38 Термин «полученный из» означает, что нуклеиновая кислота, белок или микроорганизм модифицированы или адаптированы из отличной (например, родительского или дикого типа) нуклеиновой кислоты, белка или микроорганизма с целью получения новой нуклеиновой кислоты, белка или микроорганизма. Такие модификации или адаптации, как правило, включают в себя вставку, делецию, мутацию или замену нуклеиновых кислот или генов. В целом, микроорганизм по изобретению получают из «родительского микроорганизма», который представляет собой микроорганизм, используемый для создания микроорганизма по изобретению. Родительский микроорганизм может быть встречающимся в природе микроорганизмом (т.е. микроорганизмом дикого типа) или микроорганизмом, который был предварительно модифицирован (т.е. мутантным или рекомбинантным микроорганизмом). Микроорганизм по изобретению может быть модифицирован для экспрессии или сверхэкспрессии одного или большего количества ферментов, которые не были экспрессированы или сверхэкспрессированы в родительском микроорганизме. Аналогично, микроорганизм по изобретению может быть модифицирован для

включения в него одного или большего количества генов, которые не были включены в него родительским микроорганизмом. Микроорганизм по изобретению также может быть модифицирован, чтобы не экспрессировать или экспрессировать меньшие количества одного или большего количества ферментов, которые были экспрессированы в родительском микроорганизме. В одном варианте осуществления изобретения микроорганизм по изобретению получен из родительского микроорганизма, выбранного из группы, состоящей из: *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* или *Clostridium ragsdalei*. В предпочтительном варианте осуществления изобретения микроорганизм по изобретению получен из родительского микроорганизма *Clostridium autoethanogenum* LZ1561, который был депонирован 7 июня 2010 года в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур GmbH (DSMZ), расположенной в Inhoffenstraß 7B, D-38124 Braunschweig, Германия 7 июня 2010 года в соответствии с условиями Будапештского договора о международном признании депонирования микроорганизмов для целей патентной процедуры с предоставленным инвентарным номером DSM23693. Этот штамм описан в международной патентной заявке № PCT/NZ2011/000144, которая опубликована как WO 2012/015317.

39 Микроорганизм по данному изобретению может быть дополнительно классифицирован на основе функциональных характеристик. Например, микроорганизм по данному изобретению может представлять собой или может быть получен из микроорганизма Вуда-Льонгдаля, C1-фиксирующего микроорганизма, анаэроба, ацетогена, этанологена и/или карбоксидотрофа. В таблице 1 приведен репрезентативный перечень микроорганизмов и указаны их функциональные характеристики.

Таблица 1

	Вуда-Льонгдаля	C1-фиксирующий микроорганизм	Анаэроб	Ацетоген	Этанологен	Автотроф	Карбоксидотроф
<i>Acetobacterium woodii</i>	+	+	+	+	+/- ¹	+	-
<i>Alkalibaculum bacchii</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>Blautia producta</i>	+	+	+	+	-	+	+
<i>Butyribacterium methylotrophicum</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>Clostridium aceticum</i>	+	+	+	+	-	+	+
<i>Clostridium autoethanogenum</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>Clostridium carboxidivorans</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>Clostridium coskatii</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>Clostridium drakei</i>	+	+	+	+	-	+	+
<i>Clostridium formicoaceticum</i>	+	+	+	+	-	+	+
<i>Clostridium ljungdahlii</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>Clostridium magnum</i>	+	+	+	+	-	+	+/- ²
<i>Clostridium ragsdalei</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>Clostridium scatologenes</i>	+	+	+	+	-	+	+
<i>Eubacterium limosum</i>	+	+	+	+	-	+	+
<i>Moorella thermoautotrophica</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>Moorella thermoacetica</i> (ранее <i>Clostridium thermoaceticum</i>)	+	+	+	+	- ³	+	+
<i>Oxobacter pfennigii</i>	+	+	+	+	-	+	+
<i>Sporomusa ovata</i>	+	+	+	+	-	+	+/- ⁴
<i>Sporomusa silvacetica</i>	+	+	+	+	-	+	+/- ⁵
<i>Sporomusa sphaeroides</i>	+	+	+	+	-	+	+/- ⁶
<i>Thermoanaerobacter kiuvi</i>	+	+	+	+	-	+	-

¹ *Acetobacterium woodi* может продуцировать этанол из фруктозы, но не из газа.

² Не было исследовано, можно ли выращивать *Clostridium magnum* на CO.

³ Сообщалось, что один штамм из *Moorella thermoacetica*, *Moorella* sp. HUC22-1, продуцирует этанол из газа.

⁴ Не было исследовано, можно ли выращивать *Sporomusa ovata* на CO.

⁵ Не было исследовано, можно ли выращивать *Sporomusa silvacetica* на CO.

⁶ Не было исследовано, можно ли выращивать *Sporomusa sphaeroides* на CO.

40 Термин «Вуда-Льонгдаля» относится к пути фиксации углерода Вуда-Льонгдаля, описанном, например, в Ragsdale, *Biochim Biophys Acta*, 1784: 1873-1898, 2008. «Микроорганизмы Вуда-Льонгдаля», предсказуемо, относятся к микроорганизмам, составляющим путь Вуда-Льонгдаля. В целом, микроорганизм по изобретению составляет нативный путь Вуда-Льонгдаля. В контексте данного изобретения путь Вуда-Льонгдаля может быть нативным, немодифицированным путем Вуда-Льонгдаля или он может быть путем Вуда-Льонгдаля с некоторой степенью генетической модификации (например, сверхэкспрессией, гетерологической

экспрессией, нокаутом и т.д.) при условии, что он по-прежнему функционирует для преобразования CO, CO₂ и/или H₂ в ацетил-КоА.

41 «C1» относится к молекуле с одним атомом углерода, например, CO, CO₂ или CH₃OH. «C1-оксигенат» относится к молекуле с одним атомом углерода, которая также содержит по меньшей мере один атом кислорода, например, CO, CO₂ или CH₃OH. «Источник C1-углерода» относится к молекуле с одним атомом углерода, которая служит частичным или единственным источником углерода для микроорганизма по данному изобретению. Например, источник C1-углерода может включать в себя одно или большее количество соединений, выбранных из CO, CO₂, CH₃OH или CH₂O₂. Источник C1-углерода предпочтительно включает в себя одно или большее количество соединений, выбранных из CO и CO₂. «C1-фиксирующий микроорганизм» представляет собой микроорганизм, способный продуцировать один или большее количество продуктов из источника C1-углерода. Как правило, микроорганизм по данному изобретению представляет собой C1-фиксирующую бактерию. В предпочтительном варианте осуществления изобретения микроорганизм по данному изобретению получают из C1-фиксирующего микроорганизма, приведенного в таблице 1. Для целей данного изобретения метан (CH₄) мог бы рассматриваться как источник C1-углерода, но только если бактерия по данному изобретению была сконструирована так, чтобы она составляла метаболический путь метана, как описано, например, в WO 2016/138050, поскольку ацетогенные бактерии не способны к нативному использованию метана в качестве источника углерода.

42 «Анаэроб» представляет собой микроорганизм, не требующий кислорода для роста. Анаэроб может реагировать негативно или даже умереть при наличии кислорода выше определенного порогового значения. Однако, некоторые анаэробы способны выдерживать низкие уровни кислорода (например, 0,000001-5% кислорода). Как правило, микроорганизм по данному изобретению представляет собой анаэроб. В предпочтительном варианте осуществления изобретения микроорганизм по данному изобретению получают из анаэроба, приведенного в таблице 1.

43 «Ацетогены» представляют собой облигатно-анаэробные бактерии, использующие путь Вуда-Льюнгдала в качестве их основного механизма для сохранения энергии и синтеза ацетил-КоА и продуктов, полученных из ацетил-КоА, например, ацетата (Ragsdale, *Biochim Biophys Acta*, 1784: 1873-1898, 2008). Ацетогены используют путь Вуда-Льюнгдала в качестве (1) механизма для восстановительного

синтеза ацетил-КоА из CO_2 , (2) терминального электроноакцепторного, энергосберегающего процесса, (3) механизма для фиксации (ассимиляции) CO_2 при синтезе клеточного углерода (Drake, Acetogenic Prokaryotes, In: The Prokaryotes, 3rd edition, p. 354, New York, NY, 2006). Все встречающиеся в природе ацетогены являются C1 -фиксирующими, анаэробными, автотрофными и неметанотрофными. Как правило, микроорганизм по данному изобретению представляет собой ацетоген. В предпочтительном варианте осуществления изобретения микроорганизм по данному изобретению получен из ацетогена, приведенного в таблице 1.

44 «Этанологен» представляет собой микроорганизм, который продуцирует или способен продуцировать этанол. Как правило, микроорганизм по данному изобретению представляет собой этанологен. В предпочтительном варианте осуществления изобретения микроорганизм по данному изобретению получен из этанологена, приведенного в таблице 1.

45 «Автотроф» представляет собой микроорганизм, способный расти в отсутствие органического углерода. Вместо этого автотрофы используют неорганические источники углерода, например, CO и/или CO_2 . Как правило, микроорганизм по данному изобретению представляет собой автотроф. В предпочтительном варианте осуществления изобретения микроорганизм по данному изобретению получен из автотрофа, приведенного в таблице 1.

46 «Карбоксидотроф» представляет собой микроорганизм, способный использовать CO в качестве единственного источника углерода и энергии. Как правило, микроорганизм по данному изобретению представляет собой карбоксидотроф. В предпочтительном варианте осуществления изобретения микроорганизм по данному изобретению получен из карбоксидотрофа, приведенного в таблице 1.

47 В более широком смысле, микроорганизм по данному изобретению может быть получен из микроорганизмов любого рода или вида, приведенных в таблице 1. Например, микроорганизм может быть представителем рода, выбранного из группы, состоящей из: *Acetobacterium*, *Alkalibaculum*, *Blautia*, *Butyribacterium*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Moorella*, *Oxobacter*, *Sporomusa* и *Thermoanaerobacter*. В частности, микроорганизм может быть получен из родительской бактерии, выбранной из группы, состоящей из: *Acetobacterium woodii*, *Alkalibaculum bacchii*, *Blautia producta*, *Butyribacterium methylotrophicum*, *Clostridium aceticum*, *Clostridium autoethanogenum*,

Clostridium carboxidivorans, *Clostridium coskatii*, *Clostridium drakei*, *Clostridium formicoaceticum*, *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium magnum*, *Clostridium ragsdalei*, *Clostridium scatologenes*, *Eubacterium limosum*, *Moorella thermautotrophica*, *Moorella thermoacetica*, *Oxobacter pfennigii*, *Sporomusa ovata*, *Sporomusa silvacetica*, *Sporomusa sphaeroides* и *Thermoanaerobacter kiuvi*.

48 В предпочтительном варианте осуществления изобретения микроорганизм по данному изобретению получают из кластера Clostridia, включающего в себя виды *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium coskatii*, *Clostridium ljungdahlii* и *Clostridium ragsdalei*. Такие виды были впервые описаны и охарактеризованы Abrini, *Arch Microbiol*, 161: 345-351, 1994 (*Clostridium autoethanogenum*), Tanner, *Int J System Bacteriol*, 43: 232-236, 1993 (*Clostridium ljungdahlii*) и Huhnke, WO 2008/028055 (*Clostridium ragsdalei*).

49 Эти виды имеют много общего. В частности, все эти виды являются C1-фиксирующими, анаэробными, ацетогенными, этанологичными и карбоксидотрофными представителями рода *Clostridium*. Такие виды имеют аналогичные генотипы и фенотипы и способы сохранения энергии и ферментативного метаболизма. Кроме того, эти виды объединены в кластеры в группе I гомологии клостридиальной рРНК с 16S рРНК ДНК, идентичной более чем на 99%, имеют содержание ДНК G + C, составляющее около 22-30% мол., являются грамположительными, имеют аналогичную морфологию и размер (логарифмически растущие клетки в интервале между 0,5-0,7 x 3-5 мкм), являются мезофильными (оптимально растут при температуре 30-37°C), имеют аналогичные диапазоны pH около 4-7,5 (при оптимальном значении pH около 5,5-6), не содержат цитохромов и сохраняют энергию посредством комплекса Rnf. Кроме того, как было показано, у этих видов происходит восстановление карбоновых кислот с образованием их соответствующих спиртов (Perez, *Biotechnol Bioeng*, 110:1066-1077, 2012). Важно отметить, что все эти виды также демонстрируют сильный автотрофный рост на CO-содержащих газах, продуцируют этанол и ацетат (или уксусную кислоту) в качестве основных продуктов ферментации и при определенных условиях продуцируют в небольших количествах 2,3-бутандиол и молочную кислоту.

50 Однако, эти виды также имеют целый ряд различий. Эти виды были выделены из разных источников: *Clostridium autoethanogenum* - из кишечника кролика, *Clostridium ljungdahlii* - из отходов курятников и *Clostridium ragsdalei* - из

пресноводных осадочных отложений. Эти виды отличаются по утилизации различных сахаров (например, рамнозы, арабинозы), кислот (например, глюконата, цитрата), аминокислот (например, аргинина, гистидина) и других субстратов (например, бетаина, бутанола). Кроме того, эти виды отличаются по ауксотрофии к определенным витаминам (например, тиамину, биотину). Эти виды имеют различия в последовательностях нуклеиновых кислот и аминокислот генов и белков, использующих путь Вуда-Льонгдала, хотя, как было обнаружено, общая организация и количество этих генов и белков одинаковы у всех видов (Körpe, *Curr Opin Biotechnol*, 22: 320-325, 2011).

51 Таким образом, в заключение, многие из характеристик *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium coskatii*, *Clostridium ljungdahlii* или *Clostridium ragsdalei* не являются специфическими для этих видов, но представляют собой достаточно общие характеристики для этого кластера C1-фиксирующих, анаэробных, ацетогенных, этанологичных и карбоксидотрофных представителей рода *Clostridium*. Однако, поскольку в действительности эти виды отличаются, генетическая модификация или манипулирование одним из этих видов может не иметь идентичного эффекта в другом из этих видов. Например, могут наблюдаться различия в росте, производительности или продуцировании продукта.

52 Микроорганизм по данному изобретению также может быть получен из изолята или мутанта *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium coskatii*, *Clostridium ljungdahlii* или *Clostridium ragsdalei*. Изоляты и мутанты *Clostridium autoethanogenum* включают в себя JA1-1 (DSM10061) (Abrini, *Arch Microbiol*, 161: 345-351, 1994), LBS1560 (DSM19630) (WO 2009/064200) и LZ1561 (DSM23693) (WO 2012/015317). Изоляты и мутанты *Clostridium ljungdahlii* включают в себя ATCC 49587 (Tanner, *Int J Syst Bacteriol*, 43: 232-236, 1993), PETCT (DSM13528, ATCC 55383), ERI-2 (ATCC 55380) (US 5,593,886), C-01 (ATCC 55988) (US 6,368,819), O-52 (ATCC 55989) (US 6,368,819) и OTA-1 (Tirado-Acevedo, Production of bioethanol from synthesis gas using *Clostridium ljungdahlii*, PhD thesis, North Carolina State University, 2010). Изоляты и мутанты *Clostridium ragsdalei* включают в себя PI 1 (ATCC BAA-622, ATCC PTA-7826) (WO 2008/028055).

53 Предпочтительно, микроорганизм по изобретению не является фототрофным или фотосинтезирующим. Предпочтительно, микроорганизм по изобретению не является метанотрофным.

54 Предпочтительно, микроорганизм по изобретению не является представителем рода *Alcaligenes*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Cupriavidus* (*Ralstonia*), *Rhizobium*, *Rhodospirillum* или *Pseudomonas*. В частности, микроорганизм по изобретению предпочтительно не происходит от *Rhodospirillum rubrum*, *Bacillus cereus*, *Cupriavidus necator* (ранее *Ralstonia eutropha*) или *Pseudomonas putida*. В других вариантах осуществления изобретения микроорганизм по изобретению предпочтительно не получен из *Escherichia coli*.

Ферменты

55 «Эндогенный» или «нативный» относится к нуклеиновой кислоте или белку, который присутствует или экспрессирован в микроорганизме дикого типа или родительском микроорганизме, из которого получают микроорганизм по данному изобретению. Например, эндогенный ген или белок представляет собой ген или белок, который нативно присутствует в микроорганизме дикого типа или родительском микроорганизме, из которого получают микроорганизм по данному изобретению. В одном варианте осуществления изобретения экспрессию эндогенного гена можно регулировать посредством экзогенного регуляторного элемента, например, экзогенного промотора.

56 «Экзогенный» относится к нуклеиновой кислоте или белку, который образовывается вне микроорганизма по изобретению. Например, экзогенный ген или фермент может быть создан искусственно или рекомбинантно и введен в или экспрессирован в микроорганизме по данному изобретению. Экзогенный ген или фермент также может быть выделен из гетерологичного микроорганизма и введен в или экспрессирован в микроорганизме по данному изобретению. Экзогенные нуклеиновые кислоты могут быть адаптированы, чтобы интегрировать их в геном микроорганизма по данному изобретению или оставить их во внехромосомном состоянии в микроорганизме по данному изобретению, например, в плазмиде.

57 «Гетерологический» относится к нуклеиновой кислоте или белку, который отсутствует в микроорганизме дикого типа или родительском микроорганизме, из которого получают микроорганизм по данному изобретению. Например, гетерологический ген или фермент может быть получен из отличного штамма или видов и введен в или экспрессирован в микроорганизме по данному изобретению.

58 Как правило, по меньшей мере один из ферментов, которые (a) преобразуют ацетил-КоА в ацетоацетил-КоА, (b) преобразуют ацетоацетил-КоА в 3-

гидроксibuтирил-КоА или (с) преобразуют 3-гидроксibuтирил-КоА в РНВ является гетерологичным (т.е. не нативным) по отношению к бактерии. Например, один, два или все три из этих ферментов могут быть гетерологичными (т.е. не нативными) по отношению к бактерии. Однако, если бактерия обладает нативной ферментативной активностью для одной или большего количества из этих стадий, то, возможно, не обязательно вводить гетерологичные ферменты для катализа этих стадий.

59 В контексте данного изобретения термин «экспрессия» относится к процессу, посредством которого полинуклеотид транскрибируется с матрицы ДНК (например, в мРНК или другой РНК-транскрипт), и/или к процессу, посредством которого транскрибированная мРНК впоследствии транслируется в пептиды, полипептиды или белки.

60 «Ферментативная активность» или просто «активность» в широком смысле относится к ферментативной активности, включая, но не ограничиваясь ими: к активности фермента, количеству фермента или доступности фермента, необходимого для катализирования реакции. Соответственно, «увеличение» ферментативной активности включает в себя увеличение активности фермента, увеличение количества фермента или повышение доступности фермента, необходимого для катализирования реакции. Аналогично, «уменьшение» ферментативной активности включает в себя уменьшение активности фермента, уменьшение количества фермента или уменьшение доступности фермента, необходимого для катализирования реакции.

61 «Оптимизация кодонов» относится к мутации нуклеиновой кислоты, например, геной, для оптимизированной или улучшенной трансляции нуклеиновой кислоты в конкретном штамме или видах. Оптимизация кодонов может привести к увеличенным скоростям трансляции или более высокой точности трансляции. В предпочтительном варианте осуществления изобретения гены по изобретению оптимизированы по кодонам для экспрессии в *Clostridium*, в частности, в *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium coskatii*, *Clostridium ljungdahlii* или *Clostridium ragsdalei*. В контексте данного документа термины «оптимизированные по кодонам» и «адаптированные по кодонам» могут быть использованы взаимозаменяемо.

62 Термин «варианты» включает в себя нуклеиновые кислоты и белки, чья последовательность варьируется от последовательности эталонной нуклеиновой кислоты и белка, например, последовательности эталонной нуклеиновой кислоты и белка, раскрытых в предшествующем уровне техники или приведенных в качестве

примера в данном документе. Данное изобретение может быть осуществлено на практике с использованием вариантных нуклеиновых кислот или белков, которые выполняют по существу ту же функцию, что и у эталонной нуклеиновой кислоты или белка. Например, вариантный белок может выполнять по существу ту же функцию или катализировать по существу ту же реакцию, что и эталонный белок. Вариантный ген может кодировать тот же или по существу тот же белок, что и эталонный ген. Вариантный промотор может обладать по существу такой же способностью стимулировать экспрессию одного или большего количества генов, что и эталонный промотор.

63 Такие нуклеиновые кислоты или белки могут упоминаться в данном документе как «функционально эквивалентные варианты». Например, функционально эквивалентные варианты нуклеиновой кислоты могут включать в себя аллельные варианты, фрагменты гена, мутированные гены, полиморфизмы и аналогичные варианты. Гомологичные гены из других микроорганизмов также являются примерами функционально эквивалентных вариантов. Они могут включать в себя гомологичные гены в таких видах, как *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii* или *Clostridium ljungdahlii*, подробности о которых общедоступны на веб-сайтах, например, GenBank или NCBI. Функционально эквивалентные варианты также включают в себя нуклеиновые кислоты, последовательность которых варьируется в результате оптимизации кодонов для конкретного микроорганизма. Функционально эквивалентный вариант нуклеиновой кислоты предпочтительно будет иметь 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 будет иметь по меньшей мере приблизительно 70%, приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 98% или более идентичности аминокислоты (процент гомологии) с эталонным белком. Функциональная эквивалентность варианта нуклеиновой кислоты или белка может быть оценена с использованием любого способа, известного в данной области техники.

64 Ферменты, описанные в данном документе, как правило, экспрессируются из нуклеиновой кислоты, которая была введена в микроорганизм по данному

изобретению. Нуклеиновые кислоты могут быть доставлены в микроорганизм по данному изобретению с использованием любого способа, известного в данной области техники. Например, нуклеиновые кислоты могут быть доставлены в виде голых нуклеиновых кислот или могут быть составлены с одним или большим количеством агентов, например, липосомами. Нуклеиновые кислоты могут представлять собой ДНК, РНК, кДНК или их комбинации, в зависимости от ситуации. В определенных вариантах осуществления изобретения могут быть использованы ингибиторы ограничения. Дополнительные векторы могут включать в себя плазмиды, вирусы, бактериофаги, космиды и искусственные хромосомы. В предпочтительном варианте осуществления изобретения нуклеиновые кислоты доставляются в микроорганизм по данному изобретению с использованием плазмиды. Например, преобразование (включая трансдукцию или трансфекцию) может быть достигнуто посредством электропорации, ультразвука, опосредованной полиэтиленгликолем трансформации, химической или физической компетенции, трансформации протопластов, профаговой индукции или конъюгации. В некоторых вариантах осуществления изобретения, имеющих активные системы рестрикции ферментов, это может быть необходимо для метилирования нуклеиновой кислоты перед введением нуклеиновой кислоты в микроорганизм.

65 Кроме того, нуклеиновые кислоты могут быть сконструированы таким образом, чтобы они включали в себя регуляторный элемент, например, промотор, чтобы увеличить или иным образом контролировать экспрессию конкретной нуклеиновой кислоты. Промотор может быть конститутивным промотором или индуцируемым промотором. В идеальном варианте, промотор представляет собой промотор пути Вуда-Льюнгаля, промотор ферредоксина, промотор пируват:ферредоксин-оксидоредуктазы, промотор оперона Rnf-комплекса, промотор оперона АТФ-синтазы или промотор оперона фосфотрансацетилазы/ацетаткиназы.

Субстраты

66 «Субстрат» относится к источнику углерода и/или энергии для микроорганизма по данному изобретению. Как правило, субстрат является газообразным и содержит источник C1-углерода, например, CO и/или CO₂. Предпочтительно, субстрат содержит источник C1-углерода в виде CO или CO + CO₂. Субстрат может дополнительно содержать другие неуглеродные компоненты, например, H₂, N₂ или электроны.

67 В целом, субстрат содержит по меньшей мере некоторое количество СО, например, около 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100% мол. СО. Субстрат может содержать СО в диапазоне, например, около 20-80, 30-70 или 40-60% мол. СО. Предпочтительно, субстрат содержит около 40-70% мол. СО (например, газа сталелитейных заводов или доменный газ), около 20-30% мол. СО (например, газ конвертерной печи) или около 15-45% мол. СО (например, синтез-газ). В некоторых вариантах осуществления изобретения субстрат может содержать относительно низкое количество СО, например, около 1-10 или 1-20% мол. СО. Микроорганизм по данному изобретению, как правило, преобразует по меньшей мере часть СО в субстрате в продукт. В некоторых вариантах осуществления изобретения субстрат не содержит или по существу не содержит (<1% мол.) СО.

68 Субстрат может содержать некоторое количество Н₂. Например, субстрат может содержать около 1, 2, 5, 10, 15, 20 или 30% мол. Н₂. В некоторых вариантах осуществления изобретения субстрат может содержать относительно высокое количество Н₂, например, около 60, 70, 80 или 90% мол. Н₂. В дополнительных вариантах осуществления изобретения субстрат не содержит или по существу не содержит (<1% мол.) Н₂.

69 Субстрат может содержать некоторое количество СО₂. Например, субстрат может содержать около 1-80 или 1-30% мол. СО₂. В некоторых вариантах осуществления изобретения субстрат может содержать менее чем около 20, 15, 10 или 5% мол. СО₂. В другом варианте осуществления изобретения субстрат не содержит или по существу не содержит (<1% мол.) СО₂.

70 В некоторых вариантах осуществления изобретения рост штамма, продуцирующего РНВ, сравнивают с ростом контрольного штамма («пустой плазмиды» или «ЕР») с использованием двух различных газовых смесей, содержащих СО и СО₂, с 20% Н₂ по подобию синтез-газа (50% СО, 20% СО₂, 20% Н₂, 10% аргона), обозначенных как условия «РНВ20» и «ЕР20», соответственно, или 2% Н₂ по подобию отходящего газа сталелитейных заводов (50% СО, 20% СО₂, 2% Н₂, 28% азота), обозначенных как условия «РНВ2» и «ЕР2», соответственно.

71 Хотя, как правило, субстрат является газообразным, указанный субстрат также может быть предложен в альтернативных формах. Например, субстрат может быть растворен в жидкости, насыщенной СО-содержащим газом, с использованием

дисперсионного генератора микропузырьков. В качестве дополнительного примера, субстрат может быть адсорбирован на твердой подложке.

72 Субстрат и/или источник C1-углерода может представлять собой отработанный газ, полученный в виде побочного продукта промышленного процесса или из какого-либо другого источника, например, из выхлопных газов автомобилей или от газификации биомассы. В определенных вариантах осуществления изобретения промышленный процесс выбран из группы, состоящей из: производства продукции черных металлов, например, сталелитейного производства, производства продукции из цветных металлов, переработки нефти, газификации угля, производства электроэнергии, производства чистого углерода, производства аммиака, производства метанола и производства кокса. В этих вариантах осуществления изобретения субстрат и/или источник C1-углерода может быть извлечен из промышленного процесса перед его выбросом в атмосферу с применением любого удобного способа.

73 Субстрат и/или источник C1-углерода может представлять собой синтез-газ, например, синтез-газ, полученный при газификации угля или остатков нефтеперерабатывающих заводов, газификации биомассы или лигноцеллюлозного материала или при риформинге природного газа. В другом варианте осуществления изобретения синтез-газ может быть получен в результате газификации твердых бытовых отходов или твердых промышленных отходов.

74 Композиция субстрата может оказывать значительное влияние на эффективность и/или стоимость реакции. Например, присутствие кислорода (O_2) может понизить эффективность процесса анаэробной ферментации. В зависимости от композиции субстрата может быть желательным обработать, очистить или отфильтровать субстрат для удаления любых нежелательных примесей, например, токсинов, нежелательных компонентов или частиц пыли, и/или для увеличения концентрации желаемых компонентов.

75 В определенных вариантах осуществления изобретения ферментацию или культивирование проводят в отсутствие углеводных субстратов, например, сахара, крахмала, лигнина, целлюлозы или гемицеллюлозы.

76 В контексте данного документа термин «PHBLowB» используется для отсылки к экспериментам с использованием более низкой устойчивой концентрации биомассы, например, в 3 раза более низкой устойчивой концентрации биомассы. В контексте

данного документа термин «РНВpH5,5» используется для отсылки к экспериментам, проводимым при pH 5,5. См. Фиг. 8.

Продукты

77 Микроорганизм по изобретению может быть выращен для получения одного или большего количества продуктов. В частности, микроорганизм по изобретению может продуцировать РНВ или его предшественников, например, ацетоацетил-КоА или 3-гидроксibuтирил-КоА.

78 РНВ представляет собой полимер 3-гидроксibuтиратных мономеров. РНВ, полученный в соответствии с изобретением, может содержать любое количество 3-гидроксibuтиратных мономеров, например, около 10-1000000 мономеров. В качестве дополнительных примеров, РНВ может содержать около 10-100000 мономеров, 100-100000 мономеров, 100-10000 мономеров, 500-5000 мономеров, 1000-10000 мономеров или 5000-20000 мономеров. В предпочтительном варианте осуществления изобретения РНВ содержит около 100-12000 мономеров.

79 Молекулярная масса РНВ, продуцируемого бактерией по данному изобретению, может находиться в диапазоне около 1000-100000000 Да. Например, молекулярная масса РНВ может составлять около 1000-10000 Да, 10000-1000000 Да, 10000-10000000 Да или 100000000-1000000000 Да. Предпочтительно, молекулярная масса РНВ может составлять около 10000-1000000 Да, например, 10000-100000 Да, 10000-500000 Да, 100000-500000 Да, 300000-800000 Да или 500000-1000000 Да.

80 Продуцирование РНВ часто называется процентной долей сухой клеточной массы. Микроорганизм по изобретению может продуцировать, например, 0,005-0,995% мас. РНВ. Предпочтительно, микроорганизм по изобретению продуцирует около 0,01% мас., 0,1% мас., 0,5% мас., 1% мас., 1,5% мас., 2% мас., 3% мас., 5% мас., 10% мас., 20% мас., 30% мас., 40% мас., 50% мас., 60% мас., 70% мас., 80% мас., 90% мас. или 95% мас. РНВ.

81 Физические характеристики РНВ хорошо известны в данной области техники. В грубом приближении РНВ имеет модуль Юнга, составляющий 1497-3500 МПа, предел прочности на разрыв, составляющий 18-43 МПа, относительное удлинение при разрыве, составляющее 1,9-45%, кристалличность, составляющую 60-80%, температуру плавления, составляющую 162-180°C, температуру кристаллизации, составляющую 45-116°C и/или температуру стеклования, составляющую -1,2-10°C.

82 Кроме того, микроорганизм по изобретению может также продуцировать или может быть генетически сконструирован для продуцирования других продуктов, например, этанола (WO 2007/117157), ацетата (WO 2007/117157), бутанола (WO 2008/115080 и WO 2012/053905), бутирата (WO 2008/115080), 2,3-бутандиола (WO 2009/151342 и WO 2016/094334), лактата (WO 2011/112103), бутена (WO 2012/024522), бутадиена (WO 2012/024522), метилэтилкетона (2-бутанона) (WO 2012/024522 и WO 2013/185123), этилена (WO 2012/026833), ацетона (WO 2012/115527), изопропанола (WO 2012/115527), липидов (WO 2013/036147), 3-гидроксипропионата (3-HP) (WO 2013/180581), изопрена (WO 2013/180584), жирных кислот (WO 2013/191567), 2-бутанола (WO 2013/185123), 1,2-пропандиола (WO 2014/036152), 1-пропанола (WO 2014/0369152) и продуктов, полученных из хоризмата (WO 2016/191625). В дополнение к одному или большему количеству целевых продуктов микроорганизм по изобретению также может продуцировать этанол, ацетат и/или 2,3-бутандиол. В определенных вариантах осуществления изобретения саму микробную биомассу можно рассматривать как продукт.

83 Предпочтительно, микроорганизм по изобретению не способен разлагать РНВ. Организмы, которые нативно продуцируют РНВ и другие полигидроксиалканоаты, как правило, синтезируют указанные полимеры в качестве материала накопления углерода, когда другие питательные вещества (например, азот и фосфор) ограничены, а углерод имеется в избытке. Эти организмы могут затем деполимеризовать/разлагать полимеры, когда ограниченное питательное вещество пополняется, чтобы иметь доступ к сберегаемому углероду. В целях максимизации продуцирования РНВ ненативные продуценты, например, микроорганизмы по данному изобретению, часто имеют то преимущество, что они не способны ферментативно расщеплять полимеры после их продуцирования. Это, по существу, блокирует углерод в полимерах окончательно и может повысить выход.

84 «Селективность» относится к отношению получения целевого продукта к получению всех продуктов ферментации, продуцируемых микроорганизмом. Микроорганизм по изобретению может быть сконструирован для продуцирования продуктов с определенной селективностью или с минимальной селективностью. В одном варианте осуществления изобретения целевой продукт составляет по меньшей мере около 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 50% или 75% от всех продуктов ферментации, продуцируемых микроорганизмом по изобретению. В одном варианте осуществления

изобретения целевой продукт составляет по меньшей мере 10% от всех продуктов ферментации, продуцируемых микроорганизмом по изобретению, таким образом, микроорганизм по изобретению обладает селективностью по отношению к целевому продукту, составляющей по меньшей мере 10%. В другом варианте осуществления изобретения целевой продукт составляет по меньшей мере 30% всех продуктов ферментации, продуцируемых микроорганизмом по изобретению, таким образом, микроорганизм по изобретению обладает селективностью по отношению к целевому продукту, составляющей по меньшей мере 30%.

Ферментация

85 В данном изобретении также предлагается способ получения РНВ, включающий в себя культивирование микроорганизма по изобретению в присутствии газообразного субстрата, посредством которого микроорганизм продуцирует РНВ. Газообразный субстрат, в целом, содержит один или большее количество из СО, СО₂ и Н₂.

86 Как правило, культивирование проводят в биореакторе. Термин «биореактор» включает в себя устройство для культивирования/ферментации, состоящее из одного или большего количества сосудов, колонн или разводов трубопроводов, например, реактор непрерывного действия с механическим перемешиванием (CSTR), реактор на основе иммобилизованных клеток (ICR), реактор с орошаемым слоем (TBR), барботажная колонна, газлифтный ферментер, статический смеситель или другой сосуд, или другое устройство, подходящее для вступления в контакт газа с жидкостью. В некоторых вариантах осуществления изобретения биореактор может содержать первый реактор для выращивания и второй реактор для культивирования/ферментации. Один или оба из таких реактора могут быть обеспечены субстратом. В контексте данного документа термины «культивирование» и «ферментация» используют взаимозаменяемо. Эти термины охватывают как фазу роста, так и фазу биосинтеза продукта в процессе культивирования/ферментации.

87 Культивирование, как правило, поддерживают в водной среде для культивирования, содержащей питательные вещества, витамины и/или минералы в достаточном количестве для обеспечения роста микроорганизма. Предпочтительно, водная среда для культивирования представляет собой среду для анаэробного микробного роста, например, среду для минимального анаэробного микробного роста. Подходящие среды хорошо известны в данной области техники.

88 Для получения целевого продукта культивирование желательно проводить в соответствующих условиях. Как правило, культивирование проводят в анаэробных условиях. Условия реакции, которые следует учитывать, включают в себя давление (или парциальное давление), температуру, скорость потока газа, скорость потока жидкости, pH среды, окислительно-восстановительный потенциал среды, скорость перемешивания (при применении реактора непрерывного действия с механическим перемешиванием), уровень инокулята, максимальные концентрации газового субстрата, которые гарантируют, что газ в жидкой фазе не станет ограничивающим фактором, а также максимальные концентрации продукта во избежание ингибирования продукта.

89 Работа биореактора при повышенных давлениях позволяет повысить скорость массопереноса газа из газовой фазы в жидкую фазу. Соответственно, может быть предпочтительно осуществлять ферментацию при давлениях выше атмосферного давления. Кроме того, поскольку заданная скорость преобразования газа частично зависит от времени пребывания субстрата в реакторе, при этом время пребывания в реакторе определяет требуемый объем биореактора, применение систем под давлением может значительно уменьшить требуемый объем биореактора и, следовательно, капитальные затраты на оборудование для ферментации. Это, в свою очередь, означает, что при поддержании биореакторов при повышенном давлении, а не при атмосферном давлении, может быть уменьшено время пребывания, определяемое, как объем жидкости в биореакторе, деленный на скорость потока нагнетаемого газа. Оптимальные условия реакции будут частично зависеть от конкретного используемого микроорганизма. Однако, в целом, предпочтительно проводить ферментацию при давлении выше атмосферного давления. Кроме того, поскольку заданная скорость преобразования газа частично зависит от времени пребывания субстрата в реакторе, а достижение требуемого времени пребывания в реакторе, в свою очередь, определяет требуемый объем биореактора, применение систем под давлением может значительно уменьшить требуемый объем биореактора и, следовательно, капитальные затраты на оборудование для ферментации.

90 В определенных вариантах осуществления изобретения ферментацию проводят в отсутствие света или в присутствии некоторого количества света, недостаточного для удовлетворения энергетических потребностей фотосинтезирующих или фототрофных микроорганизмов.

91 Способы по изобретению могут дополнительно включать в себя разделение или очистку РНВ. РНВ может быть отделен или очищен с использованием любого способа, известного в данной области техники. Например, клетки могут быть собраны осаждением (Chen, *Appl Microbiol Biotechnol*, 57: 50-55, 2001) или непрерывным разделением (Elbahloul, *Appl Environ Microbiol*, 75: 643-651, 2009; Heinrich, *AMB Express*, 2: 59, 2012) с последующей лиофилизацией. После сушки вымораживанием полимер может быть удален из клеток вместе с веществами, например, этилацетатом (Chen, *Appl Microbiol Biotechnol*, 57: 50-55, 2001), ацетоном (Elbahloul, *Appl Environ Microbiol*, 75: 643-651, 2009) или гипохлоритом натрия (Heinrich, *AMB Express*, 2: 59, 2012). Затем Полимер может быть удален из остаточной/солюбилизированной клеточной массы. Большое количество альтернативных способов очистки полигидроксикарбоновых кислот было опубликовано и разработано, но еще не подтверждено для очистки в больших масштабах (Kunasundari, *Express Polym Lett*, 5, 620-634, 2011).

ПРИМЕРЫ

92 Следующие ниже примеры дополнительно иллюстрируют данное изобретение, но, конечно, не должны рассматриваться как ограничивающие его объем каким-либо образом.

Пример 1

93 Этот пример демонстрирует конструкцию микроорганизма Вуда-Льюнгдаля, способного синтезировать РНВ.

94 Гены пути РНВ (*phaC*, *phaA* и *phaB*) из *C. necator* (№№ SEQ ID: 1, 4 и 7) были введены в *C. autoethanogenum*, микроорганизм Вуда-Льюнгдаля, который нативно не продуцирует РНВ. Следует отметить, что эти виды имеют значительные различия в содержании хромосомных GC. В частности, *C. necator* имеет 66% GC-содержание (Pohlmann, *Nat Biotechnol*, 24: 1257-1262, 2006), а *C. autoethanogenum* имеет только 31% GC-содержание (Brown, *Biotechnol Biofuels*, 7: 40, 2014). Предвидя проблемы экспрессии генов на основе использования кодонов, последовательности генов РНВ из *C. necator* были адаптированы к кодонам, чтобы лучше соответствовать более высокому профилю экспрессии для белков в *C. autoethanogenum*. Гены с новыми последовательностями (SEQ ID №: 3, 6 и 9), кодирующие идентичные белки, как и в

C. necator, были синтезированы и собраны в вектор экспрессии pMTL83157 (SEQ ID №: 10). Эта плазмида аналогична серии pMTL8000 (Hear, *J Microbiol Methods*, 78: 79-85, 2009) с нативным промотором Вуда-Льюнгаля, взятым из *C. autoethanogenum* для управления транскрипцией гена. Эти гены были размещены после промотора в том же порядке, в каком они появляются в геноме *C. necator*: *phaC*, *phaA* и *phaB*. Также использовали маркер отбора антибиотиков, catP. Полученная плазмида была названа pPHB_01 (SEQ ID №: 11) (Фиг. 2).

95 pPHB_01 вставили в *C. autoethanogenum* посредством бактериальной конъюгации с использованием *E. coli* HB101, как описано в другом документе (Mock, *J Bacteriol*, 197: 2965-2980, 2015). Кроме того, «пустую» плазмиду pMTL83157 вставили в *C. autoethanogenum* в качестве отрицательного контроля. Эти штаммы были затем использованы для испытания продуцирования PHB из газообразных субстратов.

96 В предпочтительном варианте осуществления изобретения микроорганизм содержит фермент, который преобразует ацетил-КоА в ацетоацетил-КоА, имеющий по меньшей мере 80% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID №: 2, фермент, который преобразует ацетоацетил-КоА в 3-гидроксibuтирил-КоА, имеющий по меньшей мере 80% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID №: 5, и/или фермент, который преобразует 3-гидроксibuтирил-КоА в полигидроксibuтират, имеющий по меньшей мере 80% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID №: 8.

Пример 2

97 Этот пример демонстрирует продуцирование PHB из газообразных субстратов в бутылках Шотта.

98 Штаммы, сконструированные в Примере 1, выращивали небольшими партиями для испытания на продуцирование PHB. Все работы проводились в строго анаэробных условиях (Hungate, *Methods in microbiology*, pages 117-132, Academic Press, New York, NY, 1969). Бутылки Шотта, выдерживающие высокое давление, содержащие модифицированную среду PETC (Körpe, *Appl Environ Microbiol*, 77: 5467-5475, 2011) с тиамфениколом для удержания плазмиды и 2-(N-морфолино)этансульфоновую кислоту для буферизации, инокулировали штаммами, и в качестве единственного

источника углерода в бутылки добавили газ, содержащий CO, CO₂, H₂ и N₂ (при 50, 18, 3 и 29%, соответственно), до 21 фунт/кв.дюйм (0,1448 МПа). Культуры клеток выращивали при 37°C при вращательном встряхивании.

99 Рост клеток периодически контролировали до тех пор, пока культуры не вступили в стационарную фазу. После завершения роста клетки больше не обрабатывали в анаэробных условиях. Клетки собрали центрифугированием, их супернатанты отбросили, заморозили при -20°C и высушили лиофилизацией.

100 Выход РНВ оценили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) таким же образом, как описано в другом документе (Karr, *Appl Environ Microbiol*, 46, 1339-1344, 1983). Вкратце, высушенные клетки обработали концентрированной серной кислотой и нагрели для преобразования РНВ в кротоновую кислоту. Образцы охладили, разбавили, отфильтровали и проанализировали методом ВЭЖХ с детектором УФ/видимого излучения для количественного определения кротоновой кислоты. Результаты первоначального продуцирования РНВ суммированы на Фиг. 3, на которой проиллюстрировано успешное продуцирование ~ 1,15% мас. РНВ в микроорганизме Вуда-Льюнгдаля.

101 Однако, учитывая низкие выходы по сравнению с нативными продуцентами, например, *Cupriavidus* и *Pseudomonas*, которые способны синтезировать полимеры, например, РНВ таким образом, что они составляют свыше 90% своего веса, представляется, что синтез РНВ из газа в микроорганизмах Вуда-Льюнгдаля не так прост, как у нативных продуцентов, растущих на негазообразных субстратах. Не желая быть связанными какой-либо конкретной теорией, авторы изобретения постулируют, что продуцирование РНВ в микроорганизмах Вуда-Льюнгдаля может потребовать адаптации кодонов, чтобы преодолеть различия в предпочтении pH, потребности в кислороде, путях использования субстрата и т.д. между микроорганизмами Вуда-Льюнгдаля и нативными продуцентами РНВ.

102 После достижения образования РНВ в *C. autoethanogenum* из газообразных субстратов работу, описанную выше, повторили с изменением условий роста в целях изучения условий, которые могут способствовать/улучшить выход РНВ. В частности, были проведены эксперименты для повторения условий, описанных выше (условие 1, Фиг. 4А), чтобы изменить композиции газа на 50/30/10/10 CO/CO₂/H₂/N₂ (условие 2, Фиг. 4В), чтобы продлить инкубацию культуры до стационарной фазы (условие 3, Фиг. 4С) и периодически обновлять газ в бутылках (условие 4, Фиг. 4D). Как

проиллюстрировано на Фиг. 4А-4D, рост был аналогичным как для сконструированного штамма, так и для контрольного штамма при всех испытанных условиях.

103 Клетки собрали и проанализировали на продуцирование РНВ, как описано выше. Результаты проиллюстрированы на Фиг. 5, где показано продуцирование ~1,65% мас. РНВ в условии 1, ~1,50% мас. РНВ в условии 2, ~1,50% мас. РНВ в условии 3 и ~0,85% мас. РНВ в условии 4.

Пример 3

104 Этот пример демонстрирует продуцирование РНВ из газообразных субстратов при непрерывной ферментации.

105 Штамм, сконструированный в Примере 1, был испытан при непрерывной ферментации с использованием газа в качестве основного источника углерода в условиях, аналогичных описанным в Valgepea, *Cell Syst*, 4: 505-515, 2017. Аналогично экспериментам, выполненным в бутылках Шотта, непрерывные культуры клеток выращивали и обрабатывали анаэробно. В отличие от бутылок Шотта, культуры клеток выращивали в непрерывном режиме в течение приблизительно 20 дней с постоянной подачей питательной среды. Для выращивания и получения РНВ использовали две разные газовые композиции: 50/20/20/10 CO/CO₂/H₂/Ar и 50/20/2/28 CO/CO₂/H₂/N₂. Поглощение газа контролировали методом масс-спектрометрии (МС) и периодически отбирали пробы для количественного определения жидких метаболитов методом ВЭЖХ.

106 РНВ не определяли количественно до завершения непрерывной ферментации. Аналогично экспериментам с бутылкой Шотта, клетки собрали центрифугированием, заморозили и высушили лиофилизацией. Высушенные клетки впоследствии проанализировали на РНВ посредством обработки серной кислотой и нагревания для преобразования РНВ в кротоновую кислоту. Затем провели количественное определение РНВ методом ВЭЖХ. Результаты продуцирования РНВ при непрерывной ферментации проиллюстрированы на Фиг. 6. В частности, микроорганизмы, выращенные на 20% газообразном водороде продуцировали ~0,45% мас. РНВ, а микроорганизмы, выращенные на 2% газообразном водороде, продуцировали ~0,25% мас. РНВ.

Пример 4

107 Этот пример демонстрирует оптимизацию ферментера для повышения продуцирования РНВ.

108 В пределах непрерывной ферментации были испытаны различные условия для увеличения содержания РНВ в клетках. Пулы ацетил-КоА и NADPH увеличиваются при более низких концентрациях биомассы (Valgepea, *Cell Syst.*, 4: 505-515, 2017). Таким образом, провели испытание, приведет ли более низкий стационарный уровень биомассы к более высокому РНВ за счет увеличения уровней пулов ацетил-КоА и NADPH. Было показано, что снижение скорости поглощения СО и, в целом, концентрации биомассы в ферментере увеличивает поток клеточных ресурсов к РНВ (Фиг. 7).

109 Другим обнаруженным фактором, повышающим РНВ, был pH. При более высоком pH меньшее количество уксусной кислоты будет диффундировать и отсоединять движущую силу протонов (PMF) (Valgepea, *Cell Syst.*, 4: 505-515, 2017). Таким образом, провели испытание, будет ли тратиться меньше энергии для поддержания PMF при увеличении pH от 5 до 5,5 или 6. Дополнительная доступная энергия обеспечит дополнительную АТФ для поддержки продуцирования РНВ посредством уменьшения продуцирования ацетата, необходимого для продуцирования АТФ. Изменение pH с 5,0 до 5,5 или 6,0 привело к увеличению продуцирования РНВ (~ в 12,5 раз при pH 5,5). Однако, значение pH 6,0 трудно сохранять, поскольку *C. autoethanogenum* оптимально растет при более кислом pH.

Пример 5

110 Этот пример демонстрирует изменения уровня транскрипции и метаболизма при продуцировании РНВ по сравнению с контрольным штаммом (пустой плазмидой).

111 Анализ данных транскриптома из секвенирования РНК был основан на ранее опубликованном R-сценарии (Valgepea, *Cell Syst.*, 4: 505-515, 2017) со следующими модификациями: использование эталонной последовательности CP006763.1 *C. autoethanogenum* и ее аннотированного генома, описанного в Brown, *Biotechnol. Biofuels*, 7: 40, 2014; добавление нуклеотидной последовательности для трех генов РНВ (SEQ ID №№ 3, 6, 9.)

112 Использовали пакет метаболомики, доступный в R (Livera and Bowne, R package, 2014) для проведения статистического анализа данных внутриклеточной

метабономики. Этот сценарий нормализует и интегрирует данные метабономики в соответствие линейной модели (De Livera, *Anal. Chem.*, 84: 10768-10776, 2012). Внутриклеточные концентрации метаболитов были нормализованы по биомассе (мкмоль/гСКМ) перед импортом данных в сценарий. Было использовано подобие линейной модели с использованием обычной статистики (т.е. небайесовской) для статистического анализа данных метаболома (De Livera, *Anal. Chem.*, 84: 10768-10776, 2012; De Livera, *Metabolomics Tools for Natural Product Discovery*, 2013).

113 Хотя аргинин не подавали, для пути аргининдеиминазы наблюдалось усиление активности, обнаружен альтернативный путь для обеспечения АТФ в ацетогенах (Valgepea, *Metab. Eng.* 41: 202-211, 2017) (значение $q < 0,01$): аргининдеиминаза (CAETHG_3021, в ~ 7 раз); орнитинкарбамоилтрансфераза (CAETHG_3022, в ~ 6 раз); карбаматкиназа (CAETHG_3025, в $\sim 3,3$ раза). Кроме того, три гена, кодирующие комплекс Rnf, который является частью комплекса энергосбережения в ацетогенах (Schuchmann and Müller, *Nat. Rev. Microbiol.* 12: 809-821, 2014), показал увеличение в ~ 2 раза в штамме PHB: (CAETHG_3231, значение $q = 0,02$; CAETHG_3228, значение $q = 0,04$ и CAETHG_3230, значение $q = 0,03$). Эти наблюдения подчеркивают изменения в энергетическом метаболизме из-за гетерологичного продуцирования. Кроме того, экспрессия двух генов пути Вуда-Льюнгдаля (WLP), кодирующего СО-дегидрогеназу/ацетил-КоА-синтазу (CAETHG_1610, в $\sim 1,4$ раза; CAETHG_1611, в $\sim 1,2$ раза) и гена, кодирующего (FeFe)-гидрогеназу (CAETHG_1691 ($\sim$ в 2,5 раза) были активированы в штамме PHB. Эти изменения могут отражать увеличение, необходимое для продуцирования ацетил-КоА и NADPH для продуцирования PHB (Фиг. 1).

114 На уровне метаболом штамм PHB имел более высокое внутриклеточное соотношение NADH/NAD^+ по сравнению с ЕР. Это предполагает потенциальные изменения в окислительно-восстановительном состоянии после экспрессии PHB. Продуцирование ацетата, основного нативного побочного продукта метаболизма *C. autoethanogenum* (Abrini, *Arch. Microbiol.*, 161: 345-351, 1994; Marcellin, *Green Chem.*, 18: 3020-3028, 2016), уменьшено по сравнению со штаммом ЕР на синтез-газе (значение $p < 0,01$; двусторонняя равная дисперсия t -испытания). На отходящем газе сталелитейного завода никаких изменений не наблюдалось.

Пример 6

115 Этот пример показывает результаты реконструкций метаболической модели в масштабе генома (GEM). Метаболическая модель в масштабе генома GEM iCLAU786 (Valgepea, *Cell Syst.*, 4: 505-515, 2017) была использована с добавлением пути PHB. Моделирование проводили для штамма PHB, выращенного на синтез-газе, во всех условиях, перечисленных выше.

116 Моделирование потока подтвердило, что было рассеяно меньшее количество CO₂ в условиях с более высоким PHB (т.е. «низкая биомасса» и «pH 5,5»). Кроме того, как было отмечено ранее (Valgepea, *Cell Syst.*, 4: 505-515, 2017), эти моделирования также показали, что CO₂ непосредственно восстанавливался до формиата посредством H₂ через активность формиат-H₂-лиазы ферментного комплекса электрон-бифуркационной гидрогеназы-формиат-дегидрогеназы (HytA-E/FdhA) (Wang, *J. Bacteriol.*, 195: 4373-4386, 2013). Это дает преимущество по сравнению с восстановлением CO₂ посредством расходования окислительно-восстановительного потенциала формиат-дегидрогеназы, потому что окислительно-восстановительный потенциал не расходуется в процессе восстановления CO₂ в WLP с использованием бывшего ферментного комплекса. Было также отмечено, что в экспериментах «низкая биомасса» и «pH 5,5» уравнивание общего количества восстановленного ферредоксина достигалось посредством увеличения или уменьшения потока для некоторых ключевых реакций, например, AOR (альдегид-ферредоксин-оксидоредуктазы), комплекса Nfn, или реакции бифуркации метилен-ТГФ-редуктазы, по сравнению с контролем (PHB20).

117 Удивительно, что «контрольное» условие (PHB20), *in silico*, имело более низкие затраты на поддержание АТР (ммоль/гСКМ/ч) и затраты на поддержание АТР от общего продуцирования АТР (%mATP) по сравнению с условием «PHBpH5,5».

118 Также было запущено моделирование для определения, являются ли АТР, NADH, NADPH или восстановленный ферредоксин (Fd_{red}) ограничивающими продуцирование PHB. Моделирование показало, что при доставке АТР продуцирование PHB (ммоль/гСКМ/ч) достигало своего максимального значения среди «ограничивающих» кандидатов во всех испытываемых условиях (т.е. «PHB20», «PHB низкая биомасса» и «PHBpH5,5»). Это наблюдение согласуется с пониманием того, что метаболизм ацетогена ограничен АТР (Schuchmann and Müller, *Nat. Rev. Microbiol.* 12: 809-821, 2014). Модель также показала, что после ограничения

посредством АТР, продуцирование PHB ограничивается наличием Fd_{red} , NADPH и затем NADH (Фиг. 8).

119 Этот результат подтверждает важность АТР и Fd_{red} как высокоэнергетических носителей в ацетогенах. Поскольку АТР преимущественно поддерживает анаболизм и работоспособность клеток, Fd_{red} имеет важное значение для энергосберегающего комплекса Rnf (Biegel, *Cell. Mol. Life Sci.* 68: 613-634, 2011) и известно, что только Fd_{red} обеспечивает электроны для восстановления CO_2 до CO в карбонильной ветви WLP (Schuchmann and Müller, *Nat. Rev. Microbiol.* 12: 809-821, 2014).

120 Все ссылки, в том числе публикации, патентные заявки и патенты, приведенные в данном документе, включены в данный документ посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая ссылка была отдельно и конкретно указана для включения посредством ссылки и изложена в данном документе в полном объеме. В данном описании ссылка на любой известный уровень техники не является и не должна рассматриваться как признание того, что такой известный уровень техники является частью общедоступных известных знаний в области деятельности в любой стране.

121 Следует считать, что применение терминов в единственном числе и аналогичных ссылок в контексте описания данного изобретения (особенно в контексте приведенной ниже формулы изобретения) включает в себя как единственное, так и множественное число, если только в данном документе не указано иное или иное явно не противоречит контексту. Термины «состоящий из», «имеющий», «включающий в себя» и «содержащий» следует рассматривать как неограничивающие термины (т.е. означающие «включая, но не ограничиваясь ими»), если не указано иное. Термин «по существу состоящий из» ограничивает объем композиции, процесса или способа указанными материалами или стадиями, или тем, что не оказывает существенного влияния на основные и новые характеристики композиции, процесса или способа. Использование альтернативы (например, «или») следует понимать, как означающее одну, обе либо любую из вышеуказанных комбинацию альтернатив. В контексте данного документа термин «около» означает $\pm 20\%$ от указанного диапазона, значения или структуры, если не указано иное.

122 Перечисление в данном документе диапазонов значений просто предназначено для того, чтобы служить сокращенным способом ссылки по отдельности на каждое отдельное значение, попадающее в указанный диапазон, если в данном документе не

указано иное, при этом каждое отдельное значение включено в данное описание, как если бы оно было отдельно приведено в данном документе. Например, любой диапазон концентраций, процентный диапазон, диапазон соотношений, диапазон целых чисел, диапазон размеров или диапазон толщин следует понимать, как включающий в себя значение любого целого числа в указанном диапазоне и, при необходимости, его доли (например, одну десятую и одну сотую целого числа), если не указано иное.

123 Все способы, описанные в данном документе, могут быть выполнены в любом подходящем порядке, если в данном документе не указано иное или иное явно не противоречит контексту. Применение любых и всех примеров или типичных формулировок (например, «например»), предложенных в данном документе, предназначено просто для лучшего освещения данного изобретения и не налагает ограничения на объем данного изобретения, если не заявлено иное. Ни одно выражение, приведенное в данном описании, не следует понимать, как указание на какой-либо незаявленный элемент, как необходимый для практического осуществления данного изобретения.

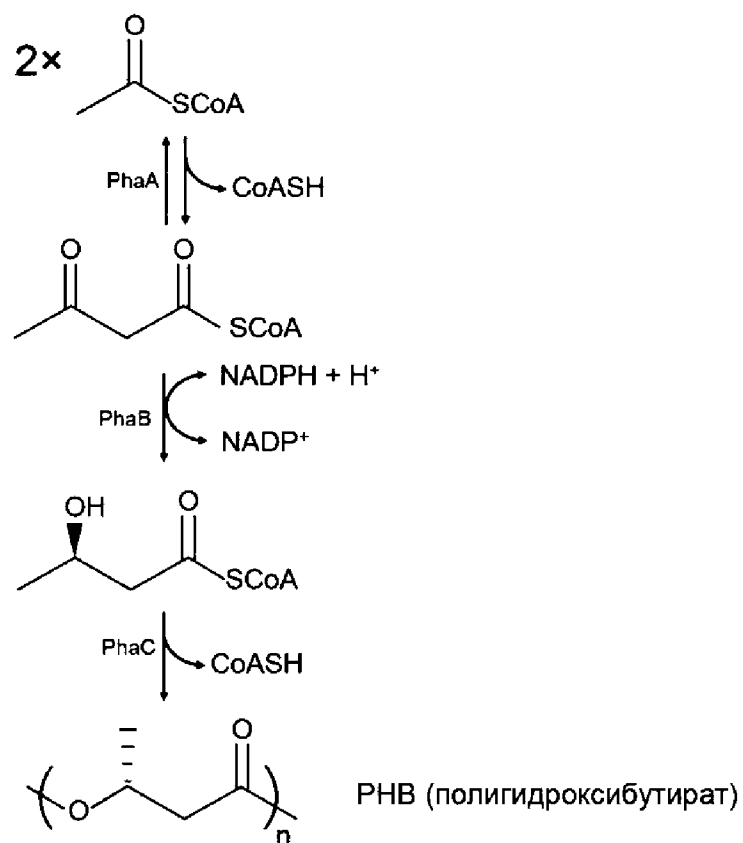
124 В данном документе описаны предпочтительные варианты осуществления данного изобретения. Вариации таких предпочтительных вариантов осуществления изобретения могут стать очевидными для специалистов в данной области техники после прочтения приведенного выше описания. Авторы изобретения ожидают, что квалифицированные специалисты будут использовать такие вариации при необходимости, при этом авторы изобретения предполагают, что данное изобретение будет осуществлено на практике иначе, чем конкретно описано в данном документе. Соответственно, данное изобретение включает в себя все модификации и эквиваленты предмета изобретения, приведенные в прилагаемой формуле изобретения, как это установлено действующим законодательством. Кроме того, любая комбинация описанных выше элементов во всех возможных их вариациях включена в данное изобретение, если в данном документе не указано иное или иное явно не противоречит контексту.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

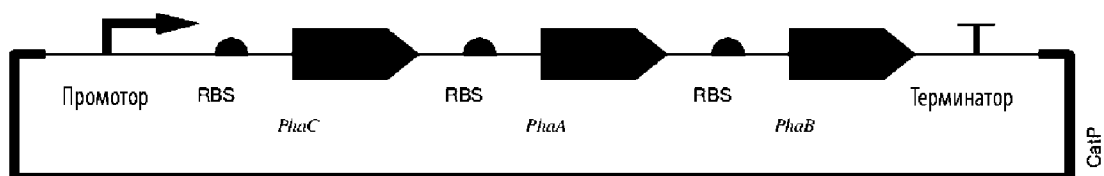
1. Не встречающийся в природе микроорганизм Вуда-Льюнгдаля, содержащий:
 - a. фермент, который преобразует ацетил-КоА в ацетоацетил-КоА,
 - b. фермент, который преобразует ацетоацетил-КоА в 3-гидроксibuтирил-КоА, а также
 - c. фермент, который преобразует 3-гидроксibuтирил-КоА в полигидроксibuтират.
2. Микроорганизм по п. 1, отличающийся тем, что фермент, который преобразует ацетил-КоА в ацетоацетил-КоА, представляет собой ацетил-КоА-С-ацетилтрансферазу (EC 2.3.1.9).
3. Микроорганизм по п. 2, отличающийся тем, что ацетил-КоА-С-ацетилтрансфераза получена из: *Acinetobacter baumannii*, *Aeromonas hydrophilia*, *Alcaligenes latus*, *Arthrosira platensis*, *Bacillus subtilis*, *Burkholderia cepacia*, *Clostridium acetobutylicum*, *Cupriavidus necator*, *Escherichia coli*, *Haloferax mediterranei*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mandelii*, *Pseudomonas oleovorans*, *Pseudomonas putida* или *Streptomyces coelicolor*.
4. Микроорганизм по п. 1, отличающийся тем, что фермент, который преобразует ацетоацетил-КоА в 3-гидроксibuтирил-КоА, представляет собой ацетоацетил-КоА-редуктазу (EC 1.1.1.36) или 3-гидроксibuтирил-КоА-дегидрогеназу (EC 1.1.1.157).
5. Микроорганизм по п. 4, отличающийся тем, что ацетоацетил-КоА-редуктаза получена из: *Acinetobacter baumannii*, *Aeromonas hydrophilia*, *Alcaligenes latus*, *Arthrosira platensis*, *Bacillus subtilis*, *Burkholderia cepacia*, *Cupriavidus necator*, *Haloferax mediterranei*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mandelii*, *Pseudomonas oleovorans*, *Pseudomonas putida* или *Streptomyces coelicolor*.
6. Микроорганизм по п. 4, отличающийся тем, что 3-гидроксibuтирил-КоА-дегидрогеназа получена из: *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium acetobutylicum* или *Clostridium kluyveri*.
7. Микроорганизм по п. 1, отличающийся тем, что фермент, который преобразует 3-гидроксibuтирил-КоА в полигидроксibuтират, представляет собой полигидроксibuтират-синтазу (EC 2.3.1.-).

8. Микроорганизм по п. 7, отличающийся тем, что полигидроксиалканоат-синтаза получена из: *Acinetobacter baumannii*, *Aeromonas caviae*, *Aeromonas hydrophilia*, *Alcaligenes latus*, *Arthrosira platensis*, *Bacillus subtilis*, *Burkholderia cepacia*, *Cupriavidus necator*, *Haloferax mediterranei*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mandelii*, *Pseudomonas oleovorans*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas* sp. 61-3, *Rhodospirillum rubrum* или *Streptomyces coelicolor*.
9. Микроорганизм по п. 1, отличающийся тем, что указанный микроорганизм является представителем рода, выбранного из группы, состоящей из: *Acetobacterium*, *Alkalibaculum*, *Blautia*, *Butyribacterium*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Moorella*, *Oxobacter*, *Sporomusa* и *Thermoanaerobacter*.
10. Микроорганизм по п. 1, отличающийся тем, что указанный микроорганизм получен из родительского микроорганизма, выбранного из группы, состоящей из: *Acetobacterium woodii*, *Alkalibaculum bacchii*, *Blautia producta*, *Butyribacterium methylotrophicum*, *Clostridium aceticum*, *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium carboxidivorans*, *Clostridium coskatii*, *Clostridium drakei*, *Clostridium formicoaceticum*, *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium magnum*, *Clostridium ragsdalei*, *Clostridium scatologenes*, *Eubacterium limosum*, *Moorella thermautotrophica*, *Moorella thermoacetica*, *Oxobacter pfennigii*, *Sporomusa ovata*, *Sporomusa silvacetica*, *Sporomusa sphaeroides* и *Thermoanaerobacter kiuvi*.
11. Микроорганизм по п. 10, отличающийся тем, что указанный микроорганизм получен из родительской бактерии, выбранной из группы, состоящей из: *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium coskatii*, *Clostridium ljungdahlii* и *Clostridium ragsdalei*.
12. Микроорганизм по п. 1, отличающийся тем, что указанный микроорганизм потребляет газообразные субстраты, содержащие один или большее количество из: CO, CO₂ и H₂.
13. Микроорганизм по п. 1, отличающийся тем, что указанный микроорганизм является анаэробным.
14. Микроорганизм по п. 1, отличающийся тем, что указанный микроорганизм не способен разлагать полигидроксибутират.
15. Микроорганизм по п. 1, отличающийся тем, что указанный микроорганизм не является фототрофным, фотосинтезирующим или метанотрофным.

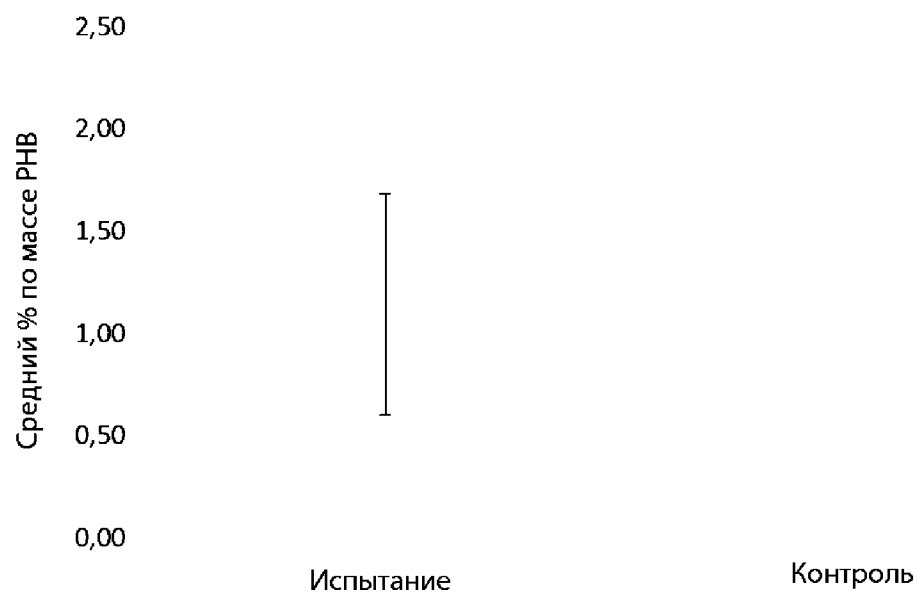
16. Способ получения полигидроксibuтирата, включающий в себя культивирование микроорганизма по п. 1 в присутствии газообразного субстрата, причем указанный микроорганизм продуцирует полигидроксibuтират.
17. Способ по п. 16, отличающийся тем, что газообразный субстрат содержит один или большее количество из: CO, CO₂ и H₂.
18. Способ по п. 16, отличающийся тем, что культивирование осуществляют в анаэробных условиях.
19. Способ по п. 16, отличающийся тем, что культивирование осуществляют в отсутствие углеводных субстратов.
20. Способ по п. 16, отличающийся тем, что культивирование осуществляют в отсутствие света.



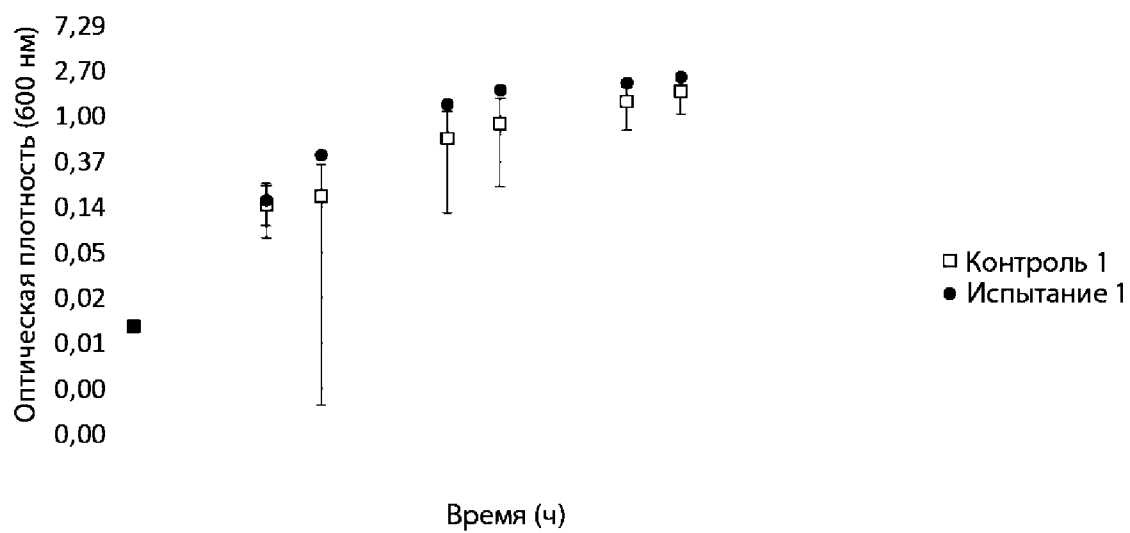
Фиг. 1



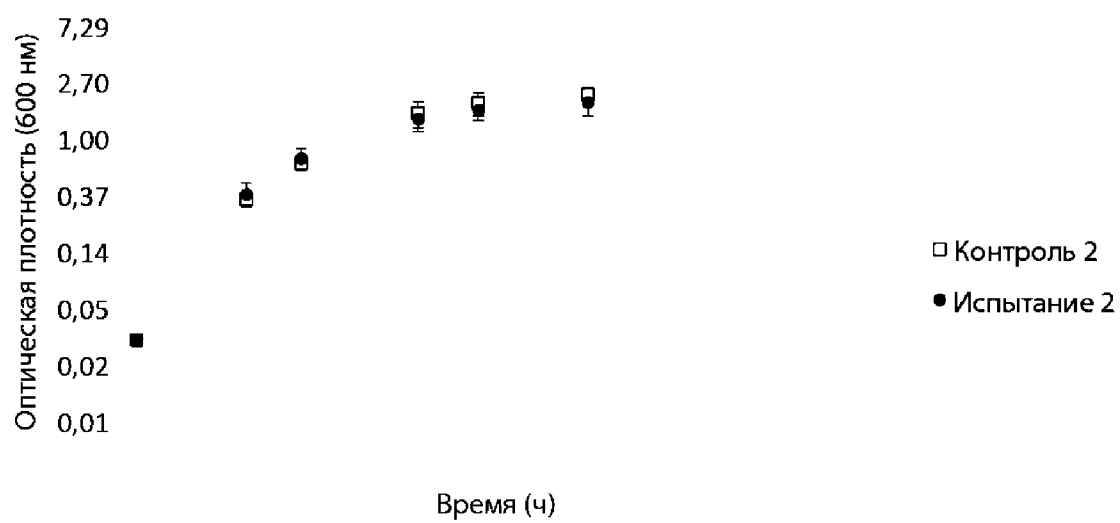
Фиг. 2



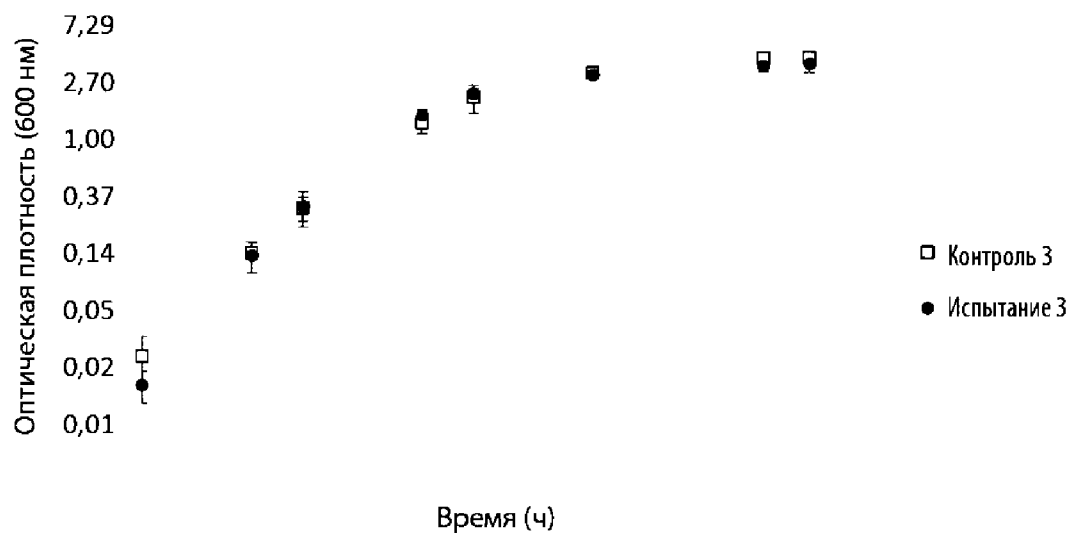
Фиг. 3



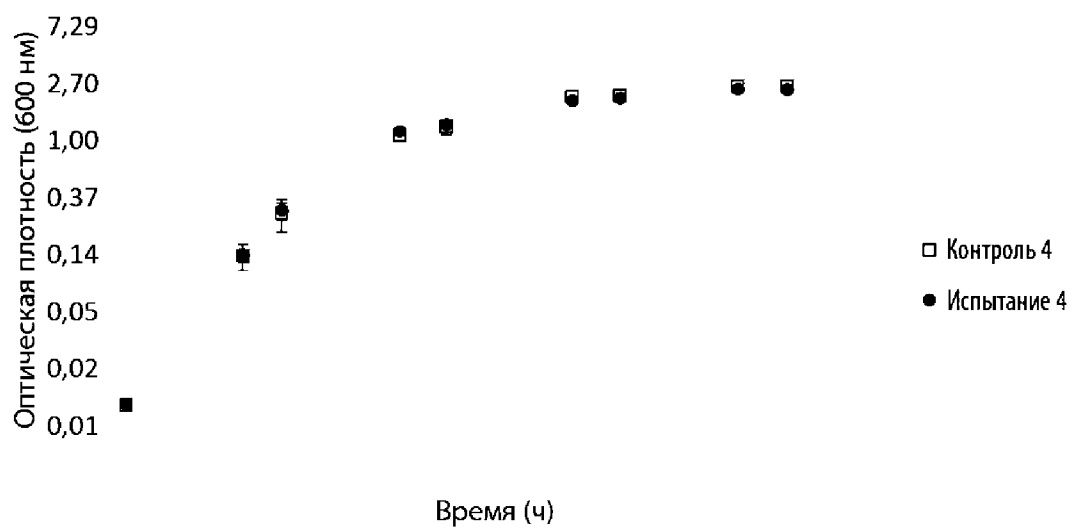
Фиг. 4А



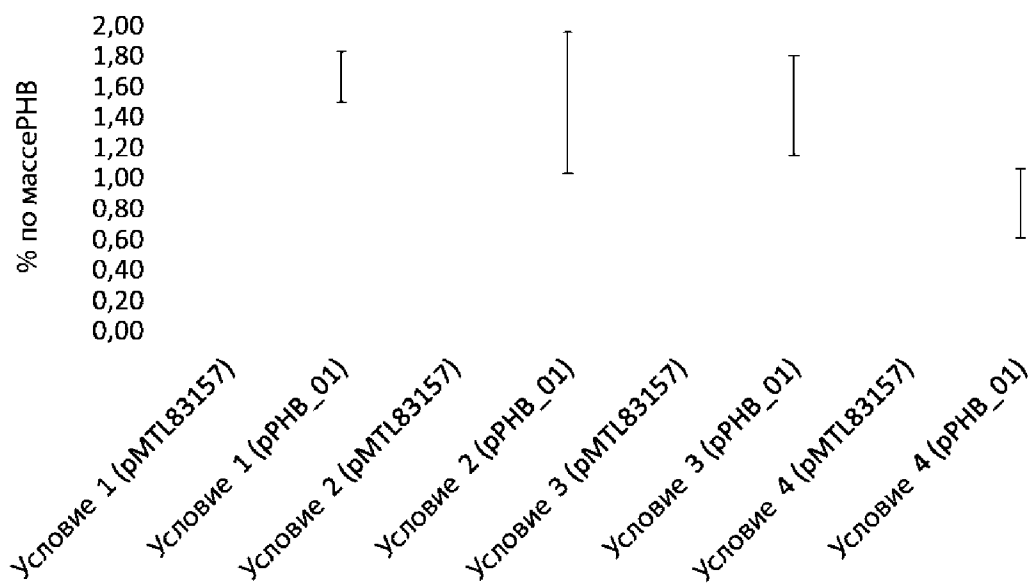
Фиг. 4В



Фиг. 4С



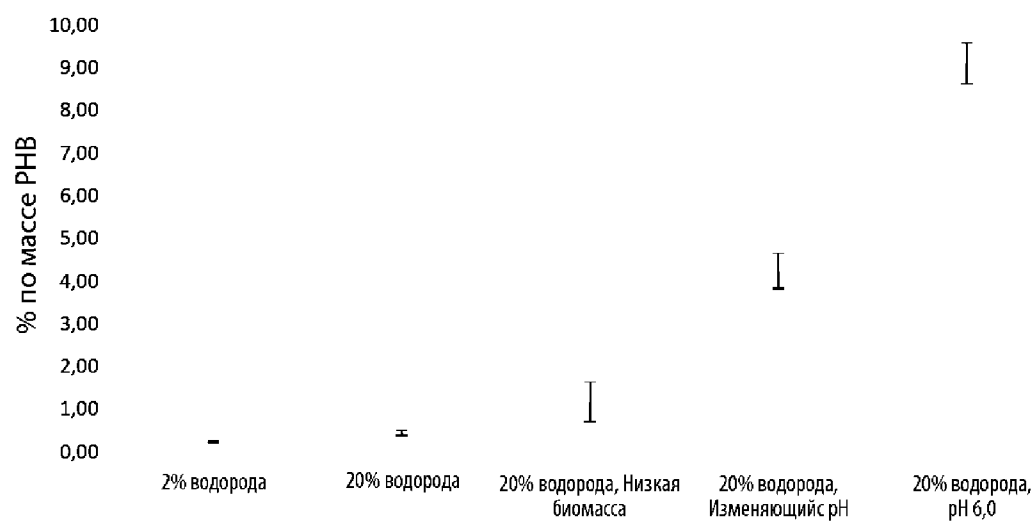
Фиг. 4D



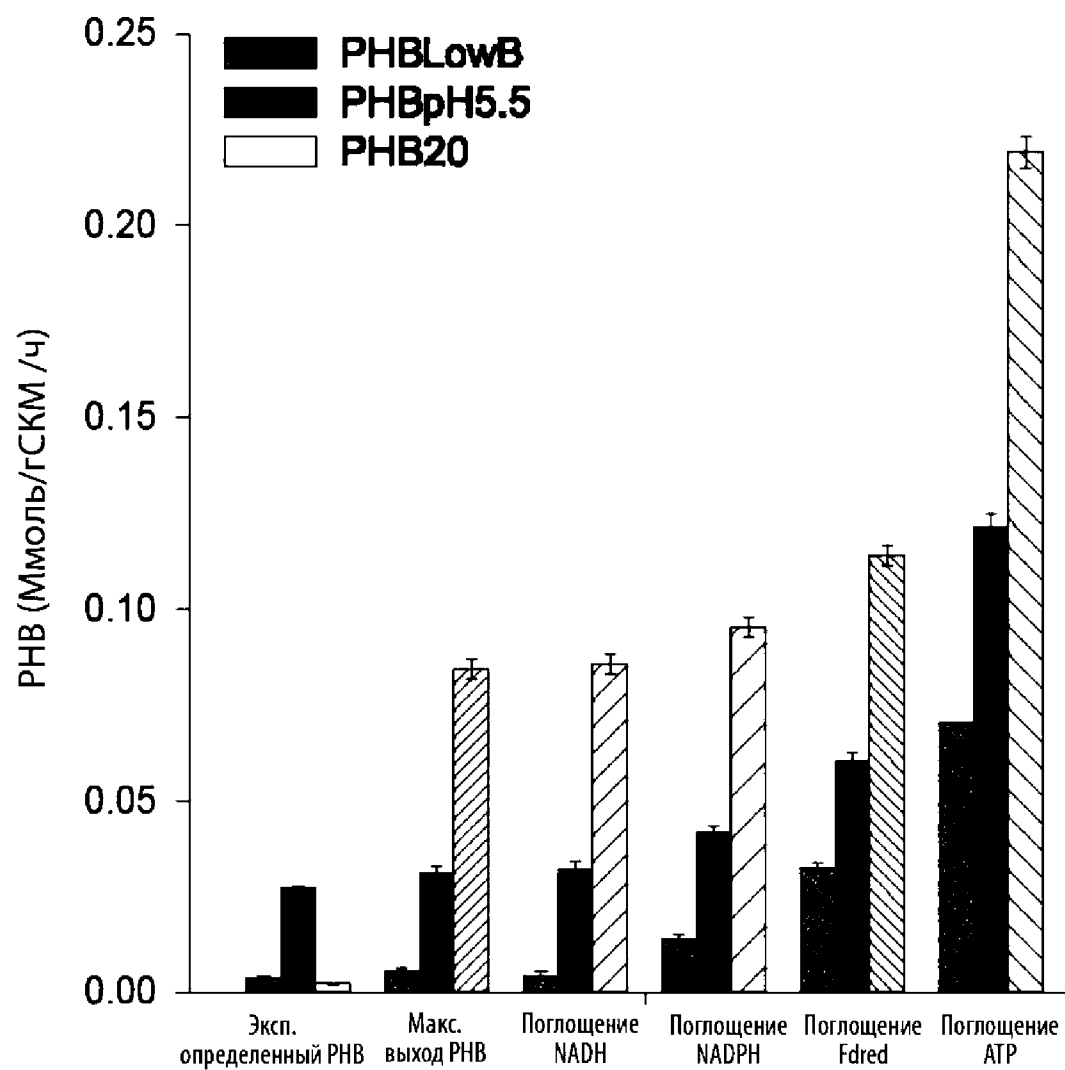
Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8