(19) Евразийское патентное ведомство

(11) 040778 (13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.07.27

(21) Номер заявки
201891335

(22) Дата подачи заявки
2016.12.02

(51) Int. Cl. ***C12N 1/38*** (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
C12P 1/04 (2006.01)

(54) ДОБАВЛЕНИЕ АРГИНИНА С ЦЕЛЬЮ ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ АЦЕТОГЕНОВ, ФЕРМЕНТИРУЮЩИХ ГАЗ

(31) **62/262,886; 62/262,888**
(32) **2015.12.03**
(33) **US**
(43) **2018.11.30**
(86) **PCT/US2016/064855**
(87) **WO 2017/096324 2017.06.08**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЛАНЦАТЕК НЗ, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Вальгепея Каспар (AU), Кёпке Михаэль, Берендорфф Джеймс Брюс Ярнтон Хэйкок (US), Марселлин Эстебан, Нильсен Ларс К., Лемгрубер Ренато де С.П. (AU)

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

(56) WO-A1-2013180584
FONKNECHTEN, NURIA et al.: "Clostridium sticklandii, a specialist in amino acid degradation: revisiting its metabolism through its genome sequence", BMC Genomics, 2010, vol. 11, p. 555 (internal p. 1-12), see abstract: p. 3, right column, pg 3; p. 5, right column, pg 1: fig. 1
SCHULZ, CHRISTIAN et al.: "Regulation of the arginine deiminase system by ArgR2 interferes with arginine metabolism and fitness of Streptococcus pneumoniae", MBio, 2014, vol. 5, № 6, e01858-14 (internal p. 1-15), see abstract
MOCK, JOHANNA et al.: "Energy conservation associated with ethanol formation from H2 and CO2 in Clostridium autoethanogenum involving electron bifurcation", Journal of Bacteriology, september 2015, vol. 197, № 18, p. 2965-2980, see the whole document
KOPKE, MICHAEL et al.: "Clostridium ljungdahlii represents a microbial production platform based on syngas", Proceedings of the National Academy of Sciences, 20 July 2010, vol. 107, № 29, p. 13087-13092, see the whole document
TONON, T. et al.: "Metabolism of arginine and its positive effect on growth and revival of Oenococcus oeni", Journal of Applied Microbiology, 2000, vol. 89, p. 526-531, see the whole document.
VALGEPEA, KASPAR et al.: Poster № 023: "Arginine boosts growth of the gas-fermenting bacterium Clostridium autoethanogenum", In: 14th international conference on the genetics, physiology and synthetic biology of solvent- and acid-forming clostridia, 28-31 August 2016, Dartmouth College, Hanover, NH, USA, p. 27, see p. 27

(57) В данном изобретении предложен способ повышения эффективности ферментации газообразного C1-содержащего субстрата при получении продукта, где аргинин добавляют в культуру в качестве единственного источника азота, при этом C1-фиксирующий микроорганизм представляет собой рекомбинантный генетически модифицированный микроорганизм Clostridium, содержащий путь метаболизма аргинина.

040778 B1

040778 B1

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Эта заявка заявляет приоритет по предварительным патентным заявкам США № 62/262886, поданной 3 декабря 2015 г., и № 62/282888, поданной 3 декабря 2015 г., все содержание которых включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

Уровень техники

Около 10% мировых потребностей в энергии и химических веществах неспецифического действия в настоящее время продуцируются из возобновляемого сырья в основном с применением выращенных сахаров. Однако все большее внимание уделяется перспективному применению непродовольственных ресурсов для достижения целей связанных с изменением климата. Ферментация газа предлагает путь к преобразованию широкого спектра недорогого промышленного сырья C1, такого как газы промышленных отходов, синтез-газ или метан, подвергнутый риформингу, в химические вещества и топливо. Полагая, что это один из первых биохимических путей, которые появились на Земле, метаболический путь Вуда-Льюнгдаля позволяет ацетогенной Clostridia вносить эти газы C1 в ацетил-КоА. Clostridium autoethanogenum, в частности, предлагает надежную и гибкую платформу для ферментации газа и применяется в промышленном масштабе. Ферментация газа с помощью C. autoethanogenum является высокоселективной, устойчивой к загрязняющим веществам, преодолевает рефрактивность процессов Фишера-Тропша и экономически оправдана даже при подаче потоков с небольшими объемами газа.

Известно, что, хотя ацетогены способны продуцировать много полезных короткоцепочечных химических веществ, продуцирование молекул углерода с более длинной цепью для применения в биодизельном или реактивном топливе выходит за пределы метаболической способности самих ацетогенных бактерий из-за АТФ-лимитирующего процесса. По данным Fast et al., несмотря на то что путь Вуда-Льюнгдаля является наилучшим вариантом для продуцирования ацетата и этанола, бутанольная ферментация является АТФ-лимитирующим процессом, что обуславливает неэффективность анаэробной продукции бутанола по пути Вуд-Льюнгдаля.

C. autoethanogenum изначально продуцирует ацетат, этанол, 2,3-бутандиол (2,3-BDO) и лактат. Если энергетические препятствия будут преодолены, синтетическая биология обещает расширить спектр продуктов C. autoethanogenum. Ацетогенные бактерии широко распространены в природе и играют важную роль в глобальном углеродном цикле, но, как считается, живут на термодинамическом краю жизни.

Энергетические характеристики пути Вуд-Льюнгдаля анаэробных ацетогенов только обретают свои очертания, но в отличие от состояний аэробного роста или гликолиза сахароферментирующих организмов в пути Вуд-Льюнгдаля АТФ не продуцируется посредством субстратного фосфорилирования, и фактически для активации CO_2 действительно необходима одна молекула АТФ и мембранный градиент (WO 2013/180584).

Генерацию АТФ посредством субстратного фосфорилирования можно применять в качестве движущей силы для синтеза продуктов, особенно в АТФ-лимитирующих системах. В частности, известно, что ацетогенные бактерии живут на термодинамическом краю жизни (Schuchmann, Nat. Rev. Microbiol., 12:809-821, 2014). Таким образом, все ацетогенные микроорганизмы, выделенные до настоящего времени, были описаны как продуцирующие ацетат (Drake, Ацетогенные прокариоты, Прокариоты, 3-е издание, с. 354-420, New York, NY, Springer, 2006; Liew et al., Понимание пути фиксации CO_2 Clostridium autethanogenum путем целевого мутагенеза, mBio, 2016, 7:e00427-16), поскольку продуцирование ацетата дает микроорганизму возможность непосредственно генерировать АТФ в результате субстратного фосфорилирования посредством Pta (фосфотрансацетилазы) (EC 2.3.1.8) и Ack (ацетаткиназы) (EC 2.7.2.1). Система Pta-Ack очень специфична для превращения ацетил-КоА в ацетат и не использует другие ацил-КоА. Несмотря на то что такие механизмы, как мембранные градиенты и ферменты бифуркации электронов, связанные с ионными или протонными транслокационными системами, например комплекс Rnf (Schuchmann, Nat. Rev. Microbiol., 12:809-821, 2014), сохраняют АТФ в этих микроорганизмах, непосредственная генерация АТФ остается крайне важной для их выживания. В результате при введении гетерологичных путей, которые не позволяют генерировать АТФ, ацетат продуцируется в виде побочного продукта (Schiel-Bengelsdorf, FEBS Lett, 586:2191-2198, 2012).

Сущность изобретения

В данном изобретении предлагается способ повышения эффективности ферментации газообразного C1-содержащего субстрата при получении продукта, при этом указанный способ включает

a) впускание потока газообразного C1-содержащего субстрата в биореактор, содержащий культуру C1-фиксирующего микроорганизма в жидкой питательной среде; и

b) ферментацию культуры с целью получения по меньшей мере одного продукта,

при этом аргинин добавляют в культуру в качестве единственного источника азота; и при этом C1-фиксирующий микроорганизм представляет собой рекомбинантный генетически модифицированный микроорганизм, содержащий путь метаболизма аргинина, и где C1-фиксирующий микроорганизм представляет собой Clostridium.

В одном из вариантов осуществления изобретения указанный путь метаболизма аргинина включает в себя путь аргининдезиминазы и/или путь аргининдекарбоксилазы, при этом путь аргининдезиминазы включает в себя один или большее количество ферментов, выбранных из группы, состоящей из аргинин-

дезиминазы (EC 3.5.3.6), орнитинкарбамоилтрансферазы (EC 2.1.3.3) и карбаматкиназы (EC 2.7.2.2), а путь аргининдекарбоксилазы включает в себя один или большее количество ферментов, выбранных из группы, состоящей из аргининдекарбоксилазы (EC 4.1.1.19), агматиндезиминазы (EC 3.5.3.12), путресцинкарбамоилтрансферазы (EC 2.1.3.6) и карбаматкиназы (EC 2.7.2.2).

В одном из вариантов осуществления изобретения указанный путь метаболизма аргинина включает в себя одно или более из сверхэкспрессированного эндогенного фермента, мутированного эндогенного фермента или экзогенного фермента.

В одном из вариантов осуществления изобретения аргинин добавляют в культуру в количестве, превышающем потребности клеток культуры вплоть до 1000 раз.

В одном из вариантов осуществления изобретения концентрация аргинина в биореакторе составляет по меньшей мере 20 мг/л.

В одном из вариантов осуществления изобретения потребность клеток культуры составляет 0,012 г аргинина на грамм клеточной биомассы.

В одном из вариантов осуществления изобретения указанный продукт выбирают из группы, состоящей из этанола, 2,3-бутандиола, 1,3-бутандиола, лактата, сукцината, метилэтилкетона (МЕК), бутирата, 2-бутанола, 1,2-пропандиола (1,2-PDO), 1-пропанола, изопропанола (IPA), ацетоина, изобутанола, изопрена, фарнезена, бисаболена, пинена, лимонена, ацетона, 3-гидроксибутирата, 2-гидроксиизомасляной кислоты (2-HIBA), цитрамалата, бутадиена, полимолочной кислоты, 1-бутанола, 3-гидроксипропионата (3-HP), бензоата, этиловых эфиров жирной кислоты, жирных кислот и изобутилена.

В одном из вариантов осуществления изобретения аргинин катаболизируется посредством пути метаболизма аргинина для продуцирования аммония, при этом C1-фиксирующий микроорганизм использует аммоний в качестве источника азота.

В одном из вариантов осуществления изобретения указанный C1-фиксирующий микроорганизм содержит разрушающую мутацию в транспортере аргинина:орнитина.

В одном из вариантов осуществления изобретения C1-фиксирующий микроорганизм содержит одну или большее количество генетических модификаций в пути метаболизма аргинина, причем одна или большее количество генетических модификаций выбраны из группы, состоящей из (i) разрушающей мутации регуляторных элементов и (ii) замены сайтов связывания оператора или нативных промоторов на конститутивные или синтетические промоторы.

В одном из вариантов осуществления изобретения указанная разрушающая мутация представляет собой нокаут репрессора аргинина argR.

В одном из вариантов осуществления изобретения указанная замена представляет собой замену промотора оперона пути аргининдезиминазы на конститутивный или синтетический промотор.

В некоторых вариантах данного изобретения аргинин добавляют в культуру в количестве, превышающем потребности клеток от 2 до 1000 раз, или от 2 до 800 раз, или от 2 до 500 раз, или от 2 до 100 раз, или от 2 до 50 раз, или от 2 до 10 раз, или от 50 до 1000 раз, или от 50 до 800 раз, или от 50 до 600 раз, или от 50 до 500 раз, или от 50 до 300 раз, или от 50 до 200 раз, или от 50 до 100 раз, или от 100 до 1000 раз, или от 100 до 800 раз, или от 100 до 600 раз, или от 100 до 500 раз, или от 100 до 300 раз, или от 100 до 200 раз.

Согласно некоторым вариантам осуществления данного изобретения аргинин добавляют в культуру таким образом, что концентрация аргинина поддерживается на уровне по меньшей мере 20 мг/л, или по меньшей мере 100 мг/л, или по меньшей мере 300 мг/л, или по меньшей мере 500 мг/л, или по меньшей мере 1 г/л, или по меньшей мере 2 г/л, или по меньшей мере 3 г/л, или по меньшей мере 4 г/л, или по меньшей мере 5 г/л, или по меньшей мере 10 г/л, или по меньшей мере 20 г/л. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения концентрация аргинина поддерживается на уровне от 20 мг/л до 20 г/л, или от 100 мг/л до 20 г/л, или от 500 мг/л до 20 г/л, или от 500 мг/л до 10 г/л, или от 1 до 10 г/л, или от 5 до 10 г/л, или от 5 до 20 г/л. В определенном варианте осуществления данного изобретения аргинин добавляют в культуру таким образом, что потребление аргинина культурой составляет по меньшей мере 20 мг аргинина на грамм сухого веса клеток, или по меньшей мере 100 мг аргинина на грамм сухого веса клеток, или по меньшей мере 1 г аргинина на грамм сухого веса клеток, или по меньшей мере 5 г аргинина на грамм сухого веса клеток, или по меньшей мере 10 г аргинина на грамм сухого веса клеток. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения аргинин добавляют в культуру таким образом, что потребление аргинина культурой составляет от 20 мг до 20 г на грамм сухого веса клеток, или от 100 мг до 20 г на грамм сухого веса клеток, или от 1 до 10 г на грамм сухого веса клеток.

Потребность клеток в аргинине для синтеза биомассы может составлять от 0,012 до 24 г на грамм биомассы. Потребность в аргинине для синтеза биомассы может составлять по меньшей мере 0,012 г на грамм биомассы, или по меньшей мере 0,024 г на грамм биомассы, до 0,048 г на грамм биомассы, или по меньшей мере 0,120 г на грамм биомассы, или по меньшей мере 0,24 г на грамм биомассы, или по меньшей мере 0,48 г на грамм биомассы, или по меньшей мере 1,2 г на грамм биомассы, или по меньшей мере 2,4 г на грамм биомассы, или по меньшей мере 4,8 г на грамм биомассы, или по меньшей мере 12 г на грамм биомассы.

Как правило, аргинин добавляют в культуру C1-фиксирующего микроорганизма в качестве компо-

нента жидкой питательной среды, которая непрерывно подается в биореактор. В других вариантах осуществления данного изобретения аргинин добавляют в биореактор независимо от жидкой питательной среды (например, путем непрерывной подачи или дозирования).

Время удвоения культуры увеличивается по меньшей мере на 10%, или по меньшей мере на 20%, или по меньшей мере на 30%, или по меньшей мере на 40%, или по меньшей мере на 50%, или по меньшей мере на 60%, или по меньшей мере на 70%, когда аргинин добавляют в культуру в количестве, превышающем потребности клеток микроорганизма, по сравнению с культурой, когда аргинин не добавляют в культуру в количестве, превышающем потребности клеток культуры.

С1-фиксирующий микроорганизм представляет собой ацетогенный карбоксидотрофный микроорганизм. Примеры подходящих С1-фиксирующих микроорганизмов включают в себя Clostridium. В различных вариантах осуществления данного изобретения микроорганизм выбирают из группы, состоящей из Clostridium autoethanogenum, Clostridium ljungdahlii, Clostridium carboxidivorans, Clostridium drakei, Clostridium scatologenes, Clostridium aceticum, Clostridium formicoaceticum, Clostridium magnum, Clostridium ragsdalei, Clostridium coskatii.

В конкретных вариантах осуществления данного изобретения С1-фиксирующий микроорганизм представляет собой Clostridium autoethanogenum или Clostridium ljungdahlii. В одном конкретном варианте осуществления данного изобретения микроорганизм представляет собой Clostridium autoethanogenum. В конкретных вариантах осуществления данного изобретения бактерия имеет идентифицирующие характеристики номера доступа DSM10061, DSM19630 или DSM23693. Эти бактерии депонированы в Немецком ресурсном центре биологического материала (DSMZ), адрес которого DSMZ GmbH Inhoffenstraße, 7 B, D-38124.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения С1-фиксирующий микроорганизм выбирают из группы, состоящей из Clostridium autoethanogenum, Clostridium ljungdahlii, Clostridium scatologenes, Clostridium drakei.

Концентрацию аргинина, добавляемого в культуру, можно повышать с целью увеличения продуцирования по меньшей мере одного АТФ-емкого продукта. Как правило, скорость продуцирования по меньшей мере одного АТФ-емкого продукта превышает по меньшей мере в 1,5 раза скорость продуцирования по меньшей мере одного АТФ-емкого продукта в тех случаях, когда аргинин не добавляют в количестве, превышающем потребности клеток культуры. Скорость продуцирования по меньшей мере одного АТФ-емкого продукта является по меньшей мере в 2 раза больше, или по меньшей мере в 3 раза больше, или по меньшей мере в 4 раза больше, или по меньшей мере в 5 раз больше, или по меньшей мере в 10 раз больше.

Как правило, АТФ-емкие продукты определяются как продукты, которые имеют непосредственную потребность в АТФ в метаболическом пути. Примеры АТФ-емких продуктов (продуктов, которые характеризуются непосредственной потребностью АТФ для синтеза, имеющего АТФ-зависимую реакцию в указанном пути) включают в себя, но не ограничиваются ими, продукты, производные от терпеноидного/мевалонатного пути, в том числе изопрен, фарнезин, бисаболен и лимонен, продукты, производные от пути жирных кислот, включая жирные кислоты, этиловые эфиры жирных кислот или молекулы, такие как 3-гидроксипропионат (3-HP) или изобутилен.

Концентрацию аргинина, добавляемого в культуру, можно повышать с целью увеличения продуцирования по меньшей мере одного продукта, выбранного из группы продуктов, которые непосредственно не требуют АТФ, но также и не выдают такого же количества АТФ на ацетил-КоА, как образование ацетата. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения концентрацию аргинина, добавляемого в культуру, повышают с целью увеличения продуцирования по меньшей мере одного продукта, выбранного из группы, состоящей из ацетона, IPA, 3-HB, 2-HIBA, 1,3-BDO, 2,3-BDO, лактата, 1,2-PDO, 1-пропанола, изобутанола, бутрирата, бутанола, цитрамалата, сукцината и MEK.

Культура может продуцировать уменьшенное количество ацетата по сравнению с культурой, в которую аргинин не добавляют в количестве, превышающем потребности клеток. Так, культура может продуцировать по меньшей мере на 10% меньше ацетата, или по меньшей мере на 20% меньше ацетата, или по меньшей мере на 30% меньше ацетата, или по меньшей мере на 40% меньше ацетата, или по меньшей мере на 50% меньше ацетата, или по меньшей мере на 60% меньше ацетата, или по меньшей мере на 80% меньше ацетата. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения чистый ацетат продуцируется в количестве менее 1 г/л ацетата, менее 0,5 г/л ацетата, менее 0,1 г/л ацетата, менее 0,05 г/л ацетата или менее 0,01 г/л ацетата.

В конкретных вариантах осуществления данного изобретения газообразный субстрат выбирают из группы, состоящей из CO, H_2 и CO_2. В конкретных вариантах осуществления данного изобретения аргинин и газообразный субстрат поглощаются культурой в соотношении по меньшей мере 2:1, или по меньшей мере 1:1, или по меньшей мере 1:2.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 приведен график, демонстрирующий рост C. autoethanogenum DSM10061 в среде определенного состава из 20 аминокислот +5 г фруктозы/л.

На фиг. 2 приведен график, демонстрирующий данные по потреблению и продуцированию амино-

кислот для C. autoethanogenum DSM10061, растущей на среде 20АК. Метка обозначает ОП при вводе проб; измерение цистеина для первых двух проб было вне диапазона калибровки.

На фиг. 3 приведен график, демонстрирующий рост для C. autoethanogenum DSM10061 на среде 14АК и 8АК вместе со сравнением со средой 20АК. Планка погрешностей представляет собой стандартное отклонение между дубликатами культур. 4x и 2x Означают 4-кратное и 2-кратное увеличение концентрации АК по сравнению с средой 20АК соответственно.

На фиг. 4 приведен график, демонстрирующий время удвоения tD для C. autoethanogenum DSM10061 для сред 14АК и 8АК по сравнению со средой 20АК. tD - время удвоения. Планка погрешностей представляет собой стандартное отклонение между дубликатами культур. 4x и 2x Означают 4-кратное и 2-кратное увеличение концентрации АК по сравнению с средой 20АК соответственно.

На фиг. 5 приведен график, демонстрирующий данные по потреблению и продуцированию аминокислот для C. autoethanogenum DSM10061 в среде 14АК 4x. 4x Означает 4-кратное увеличение концентрации АК по сравнению со средой 20АК. Метка обозначает ОП при вводе проб.

На фиг. 6 приведен график, демонстрирующий данные по потреблению и продуцированию аминокислот для C. autoethanogenum DSM10061 в среде 8АК 2x. 2x Означает 2-кратное увеличение концентрации АК по сравнению со средой 20АК. Метка обозначает ОП при вводе проб. Измерение цистеина для первой пробы было вне диапазона калибровки.

На фиг. 7 приведен график, демонстрирующий данные о росте для C. autoethanogenum DSM10061 в средах 12АК и 4АК. Планка погрешностей представляет собой стандартное отклонение между дубликатами культур.

На фиг. 8 приведен график, демонстрирующий данные по потреблению и продуцированию аминокислот для C. autoethanogenum DSM10061 в среде 12АК. Метка обозначает ОП при вводе проб.

На фиг. 9 приведен график, демонстрирующий данные по потреблению и продуцированию аминокислот для C. autoethanogenum DSM10061 в среде 4АК. Метка обозначает ОП при вводе проб. Единица измерения μM не применима к пику 8,3 мин.

На фиг. 10 приведен график, демонстрирующий данные о росте для C. autoethanogenum DSM10061 в среде 4АК с применением BugLab. BugEд, ln необработанных данных. Удельная скорость роста 0,34 ч-1 соответствует tD ~2ч.

На фиг. 11 приведен график, демонстрирующий данные о росте для C. autoethanogenum DSM10061 в бездрожжевой среде PETC-MES с 5 г аргинина/л+5 г фруктозы/л.

На фиг. 12 приведен график, демонстрирующий данные о продуцировании ацетата для C. autoethanogenum DSM10061 в бездрожжевой среде PETC-MES с 5 г аргинина/л+5 г фруктозы/л.

На фиг. 13 приведен график, демонстрирующий данные по потреблению и продуцированию аминокислот для C. autoethanogenum DSM10061 в среде с 5 г аргинина/л+5 г фруктозы/л. Метка обозначает ОП при вводе проб. Единица измерения μM не применима к пику 8,3 мин.

На фиг. 14 приведен график, демонстрирующий данные о росте для C. autoethanogenum DSM10061 в бездрожжевой среде PETC-MES с 5 г аргинина/л+5 г фруктозы/л с использованием BugLab. BugEд, ln необработанных данных. Удельная скорость роста 0,21 ч-1 соответствует tD ~3 ч.

На фиг. 15 приведен график, демонстрирующий разницу в кривой роста и показателях времени удвоения аргинина и дрожжевого экстракта экспериментах в биореакторе с фруктозой.

На фиг. 16 приведен график, демонстрирующий автотрофный рост C. autoethanogenum DSM 23693 с (△) и без (•) добавления аргинина.

На фиг. 17 приведен график, демонстрирующий автотрофный рост C. autoethanogenum DSM 23693 с (△) и без (•) добавления аргинина, а также рост аргинина только в отсутствие газа $CO/CO_2/H_2$ (□).

На фиг. 18 приведен график в логарифмическом масштабе автотрофного роста C. autoethanogenum DSM 23693 с (△) и без (•) добавления аргинина.

На фиг. 19 приведен график, демонстрирующий продуцирование ацетата при автотрофном росте C. autoethanogenum DSM 23693 с (△) и без (•) добавления аргинина.

На фиг. 20 представлено схематическое изображение пути аргининдекарбоксилазы.

На фиг. 21 представлено схематическое изображение расщепления L-аргинина в пути аргининдезиминазы.

На фиг. 22A, 22B приведена круговая диаграмма, демонстрирующая поток углерода для продуктов.

На фиг. 23 продемонстрированы ферменты, необходимые для потребления орнитина в Clostridium sticklandii.

На фиг. 24 приведена диаграмма, демонстрирующая распределение продукции АТФ при гетеротрофном росте C. autoethanogenum на средах 4АК или ARG с фруктозой.

Подробное описание изобретения

Определения и общие сведения.

Термин "в количестве, превышающим потребности клеток" относится к добавлению компонента к микроорганизму в таком количестве, которое является больше, чем количество компонента, необходимое микроорганизму для синтеза биомассы.

Термин "АТФ-емкий" относится к метаболиту, для синтеза которого АТФ (энергия) вводится по меньшей мере на одной стадии пути его синтеза (например, при наличии АТФ-зависимой реакции в этом пути).

Термин "удельная скорость роста" относится к скорости роста биомассы клеток на биомассу клетки в час.

Термин "время удвоения" относится к времени в часах, когда биомасса клеток должна удвоиться.

Термин "путь метаболизма аргинина" в широком смысле относится к любому пути, вовлеченному в метаболизм аргинина. Как правило, путь метаболизма аргинина включает в себя по меньшей мере один из путей: путь аргининдезиминазы и путь аргининдекарбоксилазы.

Термин "генетическая модификация" или "генная инженерия" в широком смысле относится к манипулированию геномом или нуклеиновыми кислотами микроорганизма. Аналогично термин "генетически сконструированный" относится к микроорганизму, содержащему манипулируемый геном или нуклеиновые кислоты. Способы генетической модификации включают, например, экспрессию гетерологичных генов, вставку или делецию гена или промотора, мутацию нуклеиновой кислоты, измененную экспрессию или инактивацию гена, ферментную инженерию, направленную эволюцию, основанную на знаниях конструкцию, способы случайного мутагенеза, перетасовку генов и оптимизацию кодонов.

Термин "рекомбинантный" указывает, что нуклеиновая кислота, белок или микроорганизм являются продуктом генетической модификации, инженерии или рекомбинации. Как правило, термин "рекомбинант" относится к нуклеиновой кислоте, белку или микроорганизму, который содержит или кодируется генетическим материалом, производным от нескольких источников, таких как два или большее количество различных штаммов или видов микроорганизмов. В данном контексте термин "рекомбинант" также можно применять для описания микроорганизма, который включает мутантную нуклеиновую кислоту или белок, включая мутированную форму эндогенной нуклеиновой кислоты или белка.

Термин "эндогенный" относится к нуклеиновой кислоте или белку, который присутствует или экспрессируется в микроорганизме дикого типа или родительском микроорганизме, из которого получают микроорганизм по данному изобретению. Например, эндогенный ген представляет собой ген, который изначально присутствует в микроорганизме дикого типа или родительском микроорганизме, из которого получают микроорганизм по данному изобретению. В одном варианте осуществления данного изобретения экспрессия эндогенного гена может контролироваться экзогенным регуляторным элементом, таким как экзогенный промотор.

Термин "экзогенный" относится к нуклеиновой кислоте или белку, который не присутствует в микроорганизме дикого типа или родительском микроорганизме, из которого получают микроорганизм по данному изобретению. В одном варианте осуществления данного изобретения экзогенный ген или фермент может быть производным от гетерологичного (т.е. другого) штамма или вида и ввести или экспрессировать в микроорганизме по данному изобретению. В другом варианте осуществления данного изобретения экзогенный ген или фермент можно искусственным или рекомбинантным путем создать и ввести или экспрессировать в микроорганизм по данному изобретению. Экзогенные нуклеиновые кислоты можно адаптировать для интеграции в геном микроорганизма по данному изобретению или для того, чтобы оставаться во внехромосомном состоянии в микроорганизме по данному изобретению, например, в плазмиде.

Термин "ферментативная активность" или просто "активность" в широком смысле относится к ферментативной активности, включая, но не ограничиваясь этим, активность фермента, количество фермента или доступность фермента для катализирования реакции. Соответственно термин "возрастающая" активность фермента включает в себя повышение активности фермента, увеличение количества фермента или увеличение доступности фермента для катализирования реакции. Аналогичным образом термин "снижающаяся" активность фермента включает в себя снижение активности фермента, уменьшение количества фермента или уменьшение доступности фермента для катализирования реакции.

Термин "мутированный" относится к нуклеиновой кислоте или белку, который был модифицирован в микроорганизме по данному изобретению по сравнению с микроорганизмом дикого типа или родительским микроорганизмом, из которого получают микроорганизм по данному изобретению. В одном варианте осуществления данного изобретения мутация может представлять собой делецию, вставку или замещение в гене, кодирующем фермент. В другом варианте осуществления данного изобретения мутация может представлять собой делецию, вставку или замещение одной или большего количества аминокислот в ферменте.

В частности, "разрушающая мутация" представляет собой мутацию, которая уменьшает или устраняет (т.е. "разрушает") экспрессию или активность гена или фермента. Разрушающая мутация может частично инактивировать, полностью инактивировать или удалять ген или фермент. Разрушающая мутация может представлять собой нокаутную мутацию (КО). Разрушающая мутация может представлять собой любую мутацию, которая уменьшает, предотвращает или блокирует биосинтез продукта, продуцируемого ферментом. Разрушающая 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, продуцирующей белок, который уменьшает или ингибирует

активность фермента или введение нуклеиновой кислоты (например, антисмысловой РНК, siРНК, CRISPR) или белка, который ингибирует экспрессию фермента. Разрушающую мутацию можно ввести любым способом, известным в данной области техники.

Введение разрушающей мутации приводит к тому, что микроорганизм по данному изобретению не продуцирует целевой продукт или по существу не продуцирует целевой продукт или продуцирует уменьшенное количество целевого продукта по сравнению с родительским микроорганизмом, из которого получают микроорганизм по данному изобретению. Например, микроорганизм по данному изобретению может не продуцировать целевой продукт или продуцировать целевой продукт в количестве, по меньшей мере на 1, 3, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или на 95% меньшем по сравнению с родительским микроорганизмом. Например, микроорганизм по данному изобретению может продуцировать менее 0,001, 0,01, 0,10, 0,30, 0,50 или 1,0 г/л целевого продукта.

Термин "оптимизация кодонов" относится к мутации нуклеиновой кислоты, такой как ген, для оптимизации или улучшения трансляции нуклеиновой кислоты в конкретном штамме или виде. Оптимизация кодонов может привести к более быстрой скорости трансляции или более высокой точности трансляции. В предпочтительном варианте осуществления данного изобретения гены по данному изобретению представляют собой кодон, оптимизированный для экспрессии в Clostridium, в частности, Clostridium autoethanogenum, Clostridium ljungdahlii, или Clostridium ragsdalei. В еще одном предпочтительном варианте осуществления данного изобретения гены по данному изобретению представляют собой кодоны, оптимизированные для экспрессии в Clostridium autoethanogenum LZ1561, который депонирован в DSMZ под номером доступа DSM23693.

Термин "сверхэкспрессированный" относится к увеличению экспрессии нуклеиновой кислоты или белка в микроорганизме по данному изобретению по сравнению с микроорганизмом дикого типа или родительским микроорганизмом, из которого получают микроорганизм по данному изобретению. Сверхэкспрессия может быть достигнута с помощью любых способов, известных в данной области техники, включая модификацию количества копий гена, скорости транскрипции гена, скорости трансляции гена или скорости ферментного расщепления.

Термин "варианты" включает в себя нуклеиновые кислоты и белки, последовательность которых отличается от последовательности эталонной нуклеиновой кислоты и белка, такой как последовательность эталонной нуклеиновой кислоты и белка, описанная в предшествующем уровне техники или проиллюстрированная в данном документе примерами. Данное изобретение может быть осуществлено на практике с применением вариантов нуклеиновых кислот или белков, которые выполняют по существу ту же функцию, что и эталонная нуклеиновая кислота или белок. Например, вариант белка может выполнять по существу ту же функцию или катализировать по существу ту же реакцию, что и эталонный белок. Вариант гена может кодировать тот же или по существу тот же белок, что и эталонный ген. Вариантный промотор может иметь по существу такую же способность стимулировать экспрессию одного или большего количества генов, что и эталонный промотор.

Такие нуклеиновые кислоты или белки могут называться в данном документе "функционально эквивалентными вариантами". В качестве примера функционально эквивалентные варианты нуклеиновой кислоты могут включать аллельные варианты, фрагменты гена, мутированные гены, полиморфизмы и тому подобное. Гомологичные гены других микроорганизмов также являются примерами функционально эквивалентных вариантов. К ним относятся гомологичные гены у таких видов, как Clostridium acetobutylicum, Clostridium beijerinckii, или Clostridium Ijungdahlii, информация о которых находится в открытом доступе на веб-сайтах, таких как Genbank или NCBI. Функционально эквивалентные варианты также включают в себя нуклеиновые кислоты, последовательность которых изменяется в результате оптимизации кодонов для конкретного микроорганизма. Функционально эквивалентный вариант нуклеиновой кислоты предпочтительно будет иметь по меньшей мере около 70%, около 80%, около 85%, около 90%, около 95%, около 98% или более идентичности последовательности нуклеиновой кислоты (процент гомологии) с эталонной нуклеиновой кислотой. Функционально эквивалентный вариант белка предпочтительно будет иметь по меньшей мере около 70%, около 80%, около 85%, около 90%, около 95%, около 98% или более идентичности аминокислоты (процент гомологии) с эталонным белком. Функциональную эквивалентность варианта нуклеиновой кислоты или белка можно оценить с помощью любого способа, известного в данной области техники.

Нуклеиновые кислоты можно доставить в микроорганизм по данному изобретению с помощью любого способа, известного в данной области техники. Например, нуклеиновые кислоты можно доставить в виде оголенных нуклеиновых кислот или можно скомпоновать с одним или большим количеством агентов, таких как липосомы. Нуклеиновые кислоты могут представлять собой ДНК, РНК, кДНК или их комбинации, что является подходящим. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения могут применяться ингибиторы рестрикции. Дополнительные векторы могут включать в себя плазмиды, вирусы, бактериофаги, космиды и искусственные хромосомы. В предпочтительном варианте осуществления данного изобретения нуклеиновые кислоты доставляют в микроорганизм по данному изобретению с помощью плазмиды. В качестве примера трансформация (включая трансдукцию или трансфекцию) может быть достигнута путем электропорации, ультразвуковой обработки, трансформации, опосредованной

полиэтиленгликолем, химической или естественной компетентности, трансформации протопластов, индукции профагов или конъюгации. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, имеющих активные системы рестрикционных ферментов, может оказаться необходимым метилировать нуклеиновую кислоту до введения нуклеиновой кислоты в микроорганизм.

Кроме того, нуклеиновые кислоты можно сконструировать так, чтобы они содержали регуляторный элемент, такой как промотор, для увеличения или иного контроля экспрессии конкретной нуклеиновой кислоты. Промотор может быть конститутивным промотором или индуцибельным промотором. В идеальном варианте промотор представляет собой промотор пути Вуд-Льюнгдаля, промотор ферредоксина, промотор пирувата:ферредоксин-оксидоредуктазы, промотор оперона комплекса Rnf, промотор оперона АТФ-синтазы или промотор оперона фосфотрансанетилазы/ацетаткиназы.

"Микроорганизм" представляет собой микроскопический организм, особенно бактерию, архею, вирус или гриб. Как правило, микроорганизм по данному изобретению представляет собой бактерию. В данном контексте термин "микроорганизм" следует применять для обозначения "бактерии".

"Родительский микроорганизм" представляет собой микроорганизм, применяемый для генерирования микроорганизма по данному изобретению. Родительский микроорганизм может быть природным микроорганизмом (т.е. микроорганизмом дикого типа) или микроорганизмом, который был ранее модифицирован (т.е. мутантным или рекомбинантным микроорганизмом). Микроорганизм по данному изобретению можно также модифицировать для экспрессии или сверхэкспрессии одного или большего количества ферментов, которые не были экспрессированы или сверхэкспрессированы в родительском микроорганизме. Аналогичным образом микроорганизм по данному изобретению можно модифицировать для того, чтобы он содержал один или большее количество генов, которых не было в родительском микроорганизме. Микроорганизм по данному изобретению можно также модифицировать с целью отсутствия экспрессии или экспрессии более низкого уровня одного или большего количества ферментов, которые были экспрессированы в родительском микроорганизме. В одном варианте осуществления данного изобретения родительский микроорганизм представляет собой Clostridium autoethanogenum, Clostridium ljungdahlii или Clostridium ragsdalei. В предпочтительном варианте осуществления данного изобретения родительский микроорганизм представляет собой Clostridium autoethanogenum LZ1561, который был депонирован 7 июня 2010 г. в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), расположенным по адресу Inhoffenstraß 7B, D-38124 Braunschweig, Германия, 7 июня 2010 г. в соответствии с условиями Будапештского договора и получил номер доступа DSM23693.

Термин "производный от" указывает, что нуклеиновая кислота, белок или микроорганизм модифицированы или адаптированы из другой (например, родительской или дикого типа) нуклеиновой кислоты, белка или микроорганизма с целью получения новой нуклеиновой кислоты, белка или микроорганизма. Такие модификации или адаптации обычно включают в себя вставку, делецию, мутацию или замещение нуклеиновых кислот или генов. Как правило, микроорганизм по данному изобретению является производным от родительского микроорганизма. В одном варианте осуществления данного изобретения микроорганизм по данному изобретению является производным от Clostridium autoethanogenum, Clostridium ljungdahlii или Clostridium ragsdalei. В предпочтительном варианте осуществления данного изобретения микроорганизм по данному изобретению является производным от Clostridium autoethanogenum LZ1561, который депонирован в DSMZ под номером доступа DSM23693.

Микроорганизм по данному изобретению можно дополнительно классифицировать на основе функциональных характеристик. Например, микроорганизм по данному изобретению может представлять собой или может быть производным от С1-фиксирующего микроорганизма, анаэроба, ацетогена, этанологена, карбоксидотрофа и/или метанотрофа. В таблице ниже представлен репрезентативный перечень микроорганизмов и указаны их функциональные характеристики.

	C1-фиксация	Анаэроб	Ацетоген	Этанологен	Автотроф	Карбоксидотроф	Метанотроф
Acetobacterium woodii	+	+	+	+/- [1]	-	-	-
Alkalibaculum bacchii	+	+	+	+	+	+	-
Blautia product	+	+	+	-	+	+	-
Butyribacterium methylotrophicum	+	+	+	+	+	+	-
Clostridium aceticum	+	+	+	-	+	+	-
Clostridium autoethanogenum	+	+	+	+	+	+	-
Clostridium carbonicivorans	+	+	+	+	+	+	-
Clostridium coskatii	+	+	+	+	+	+	-
Clostridium drakei	+	+	+	-	+	+	-
Clostridium formicoaceticum	+	+	+	-	+	+	-
Clostridium ljungdahlii	+	+	+	+	+	+	-
Clostridium magnum	+	+	+	-	+	+/- [2]	-
Clostridium ragsdalei	+	+	+	+	+	+	-
Clostridium scatologenes	+	+	+	-	+	+	-
Eubacterium limosum	+	+	+	-	+	+	-
Moorella thermautotrophica	+	+	+	+	+	+	-
Moorella thermoacetica (прежнее название *Clostridium thermoaceticum*)	+	+	+	- [3]	+	+	-
Oxobacter pfennigii	+	+	+	-	+	+	-
Sporomusa ovata	+	+	+	-	+	+/- [4]	-
Sporomusa silvacetica	+	+	+	-	+	+/- [5]	-
Sporomusa sphaeroides	+	+	+	-	+	+/- [6]	-
Thermoanaerobacter kiuvi	+	+	+	-	+	-	-

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

[2] Не изучено, может ли Clostridium magnum расти на CO.

[3] Один штамм Moorella thermoacetica, Moorella sp. HUC22-1, как сообщается, продуцирует этанол из газа.

[4] Не изучено, может ли Sporomusa ovata расти на CO.

[5] Не изучено, может ли Sporomusa silvacetica расти на CO.

[6] Не изучено, может ли Sporomusa sphaeroides расти на CO.

"C1" относится к молекуле с одним углеродом, например CO, CO_2, CH_4 или CH_3OH. "C1-оксигенат" относится к молекуле с одним углеродом, которая также содержит по меньшей мере один атом кислорода, например CO, CO_2 или CH_3OH. "Источник C1-углерода" относится к одной молекуле углерода, которая служит в качестве частичного или единственного источника углерода для микроорганизма по данному изобретению. Например, источник C1-углерода может содержать один или большее количество из CO, CO_2, CH_4, CH_3OH или CH_2O_2. Предпочтительно источник C1-углерода содержит один или оба из CO и CO_2. "C1-фиксирующий микроорганизм" представляет собой микроорганизм, который обладает способностью 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 данного изобретения микроорганизм по данному изобретению является производным от C1-фиксирующего микроорганизма, указанного в таблице выше.

"Анаэроб" представляет собой микроорганизм, который не требует кислорода для роста. Анаэроб может отрицательно реагировать или даже погибнуть, если кислород присутствует выше определенного порога. Как правило, микроорганизм по данному изобретению представляет собой анаэроб. В предпочтительном варианте осуществления данного изобретения микроорганизм по данному изобретению является производным от анаэроба, указанного в таблице выше.

"Ацетогенами" являются облигатно анаэробные бактерии, которые используют путь Вуд-Льюнгдаля в качестве основного механизма сохранения энергии и для синтеза ацетил-КоА и продуктов, производных от ацетил-КоА, таких как ацетат (Ragsdale, Biochim Biophys Acta, 1784:1873-1898, 2008). Ацетогены используют путь ацетил-КоА как

(1) механизм редуктивного синтеза ацетил-КоА из CO_2;

(2) процесс сохранения энергии, связанный с акцепцией терминальнх электронов;

(3) механизм фиксации (ассимиляции) CO_2 в синтез клеточного углерода (Drake, Ацетогенные про-

кариоты, в "Прокариоты", 3-е издание, стр. 354, New York, NY, 2006).

Все природные ацетогены являются C1-фиксирующими, анаэробными, автотрофными и неметанотрофными. Как правило, микроорганизм по данному изобретению является ацетогеном. В предпочтительном варианте осуществления данного изобретения микроорганизм по данному изобретению является производным от ацетогена, указанного в таблице выше.

"Этанологен" представляет собой микроорганизм, который продуцирует или способен продуцировать этанол. Как правило, микроорганизм по данному изобретению является этанологеном. В предпочтительном варианте осуществления данного изобретения микроорганизм по данному изобретению является производным от этанологена, указанного в таблице выше.

"Автотроф" представляет собой микроорганизм, способный расти в отсутствие органического углерода. Вместо него автотрофы используют неорганические источники углерода, такие как CO и/или CO_2. Как правило, микроорганизм по данному изобретению является автотрофом. В предпочтительном варианте осуществления данного изобретения микроорганизм по данному изобретению является производным от автотрофа, указанного в таблице выше.

"Карбоксидотроф" представляет собой микроорганизм, способный использовать CO в качестве единственного источника углерода. Как правило, микроорганизм по данному изобретению является карбоксидотрофом. В предпочтительном варианте осуществления данного изобретения микроорганизм по данному изобретению является производным от карбоксидотрофа, указанного в таблице выше.

"Метанотроф" представляет собой микроорганизм, способный использовать метан в качестве единственного источника углерода и энергии. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения микроорганизм по данному изобретению является производным от метанотрофа.

В более широком смысле микроорганизм по данному изобретению может быть производным от любого рода или вида, указанного в таблице выше.

В предпочтительном варианте осуществления данного изобретения микроорганизм по данному изобретению является производным от группы Clostridia, содержащий вид Clostridium autoethanogenum, Clostridium ljungdahlii и Clostridium ragsdalei. Эти 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).

Эти три вида имеют много общих характеристик. В частности, все эти виды являются C1-фиксирующими анаэробными, ацетогенными, этанологенными и карбоксидотрофными представителями рода Clostridium. Эти виды имеют сходные генотипы и фенотипы, а также пути сохранения энергии и ферментативного метаболизма. Более того, эти виды группируются в группу I гомологии клостриальной рРНК с ДНК 16S рРНК, которая является более чем на 99% идентичной, имеют показатель содержания ДНК G+C, составляющий 22-30 мол.%, являются грамположительными, имеют сходную морфологию и размер (логарифмический рост клеток между 0,5-0,7×3- мкм), являются мезофильными (оптимально растут при 30-37°C), имеют сходные диапазоны pH 4-7,5 (с оптимальным pH 5,5-6), не содержат цитохромов и сохраняют энергию посредством комплекса Rnf. Кроме того, для этих видов было доказано восстановление карбоновых кислот до их соответствующих спиртов (Perez, Biotechnol. Bioeng., 110:1066-1077, 2012). Важно отметить, что эти виды также демонстрируют сильный автотрофный рост на CO-содержащих газах, продуцируют этанол и ацетат (или уксусную кислоту) в качестве основных продуктов ферментации, а при определенных условиях продуцируют небольшие количества 2,3-бутандиола и молочной кислоты.

Однако эти три вида также имеют ряд отличий. Эти виды были выделены из разных источников: Clostridium autoethanogenum - из кишечника кролика, Clostridium ljungdahlii - из мусора двора для кур, а Clostridium ragsdalei - из осадка пресноводного водоема. Эти виды отличаются использованием различных сахаров (например, рамнозы, арабинозы), кислот (например, глюконата, цитрата), аминокислот (например, аргинина, гистидина) и других субстратов (например, бетаина, бутанола). Более того, эти виды отличаются ауксотрофией относительно некоторых витаминов (например, тиамина, биотина). Эти виды имеют различия в нуклеиновых и аминокислотных последовательностях генов и белков пути Вуда-Льюнгдаля, хотя общая организация и количество этих генов и белков оказались одинаковыми у всех видов Körke, Curr. Opin. Biotechnol., 22:320-325, 2011).

Таким образом, в целом многие характеристики Clostridium autoethanogenum, Clostridium ljungdahlii или Clostridium ragsdalei не являются специфическими для этого вида, но являются довольно общими характеристиками для этого кластера C1-фиксирующих, анаэробных, ацетогенных, этанологенных и карбоксидотрофных представителей рода Clostridium. Однако, поскольку эти виды являются по сути различными, генетическая модификация или манипуляция одним из этих видов может не иметь одинакового эффекта у другого из этих видов. Например, могут наблюдаться различия в росте, функциональности или продуцировании продукта.

Микроорганизм по данному изобретению также может быть производным от изолята или мутанта Clostridium autoethanogenum, 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). 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 5593886), C-01 (ATCC 55988) (US 6368819), O-52 (ATCC 55989) (US 6368819) и OTA-1 (Tirado-Acevedo, Продуцирование биоэтанола из синтез-газа с применением Clostridium ljungdahlii, диссертация на соискание научной степени кандидата наук, Государственный университет Северной Каролины, 2010). Изоляты и мутанты Clostridium ragsdalei включают в себя PI 1 (ATCC BAA-622, ATCC PTA-7826) (WO 2008/028055).

"Субстрат" относится к углероду и/или источнику энергии для микроорганизма по данному изобретению. Как правило, субстрат является газообразным и содержит источник C1-углерода, например CO, CO_2 и/или CH_4. Предпочтительно субстрат содержит источник C1-углерода или CO+CO_2. Субстрат может дополнительно содержать другие не углеродные компоненты, такие как H_2, N_2, или электроны.

Как правило, субстрат содержит по меньшей мере некоторое количество CO, такое как 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 мол.% CO. Субстрат может содержать диапазон CO, такой как 20-80, 30-70 или 40-60 мол.% CO. Предпочтительно субстрат содержит 40-70 мол.% CO (например, газ для сталеплавления или доменный газ), 20-30 мол.% CO (например, газ для основной сталеплавильной печи с подачей кислорода) или 15-45 мол.% CO (например, синтез-газ). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения субстрат может содержать относительно низкое количество CO, такое как 1-10 или 1-20 мол.% CO. Как правило, микроорганизм по данному изобретению превращает по меньшей мере часть CO в субстрате в продукт. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения субстрат не содержит или по существу не содержит (<1 мол.%) CO.

Субстрат может содержать некоторое количество H_2. Например, субстрат может содержать 1, 2, 5, 10, 15, 20 или 30 мол.% H_2. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения субстрат может содержать относительно высокое количество H_2, например 60, 70, 80 или 90 мол.% H_2. В дополнительных вариантах осуществления данного изобретения субстрат не содержит или по существу не содержит (<1 мол.%) H_2.

Субстрат может содержать некоторое количество CO_2. Например, субстрат может содержать 1-80 или 1-30 мол.% CO_2. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения субстрат может содержать менее 20, 15, 10 или 5 мол.% CO_2. В другом варианте осуществления данного изобретения субстрат не содержит или по существу не содержит (<1 мол.%) CO_2.

Несмотря на то что субстрат обычно является газообразным, субстрат также может быть предложен в альтернативных формах. Например, субстрат может быть растворен в жидкости, насыщенной CO-содержащим газом, с помощью генератора микропузырьковой дисперсии. В качестве дополнительного примера субстрат может быть адсорбирован на твердой подложке.

Субстратом и/или источником C1-углерода может быть отработанный газ, полученный в качестве побочного продукта промышленного процесса или полученный из какого-либо другого источника, например из автомобильных выхлопных газов или газификации биомассы. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения промышленный процесс выбирают из группы, состоящей из производства изделий из черных металлов, например, сталелитейного производства, производства цветных металлов, процессов переработки нефти, газификации угля, производства электроэнергии, производства углеродной сажи, производства аммиака, производства метанола и производства кокса. В этих вариантах осуществления данного изобретения субстрат и/или источник C1-углерода может быть отобран из промышленного процесса до его выброса в атмосферу с помощью любого удобного способа.

Субстратом и/или источником C1-углерода может быть синтез-газ, такой как синтез-газ, полученный путем газификации угля или остатков процесса нефтепереработки, газификации биомассы или лигноцеллюлозного материала, или риформинга природного газа. В другом варианте осуществления данного изобретения синтез-газ может быть получен из газификации бытовых твердых отходов или промышленных твердых отходов.

Композиция субстрата может оказать значительное влияние на эффективность и/или стоимость реакции. Например, присутствие кислорода (O_2) может снизить эффективность анаэробного ферментационного процесса. В зависимости от композиции субстрата, может оказаться желательным обработать, почистить или отфильтровать субстрат для удаления любых нежелательных примесей, таких как токсины, нежелательных компонентов или пылевых частиц, и/или увеличить концентрацию желаемых компонентов.

Микроорганизм по данному изобретению может быть культивирован для продуцирования одного или большего количества продуктов. Например, Clostridium autoethanogenum продуцирует или может быть сконструирована для продуцирования 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), лактата (WO 2011/112103), бутена (WO 2012/024522), бутадиена (WO 2012/024522), метилэтилкетона (2-бутанона) (WO 2012/024522 и WO (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 2014/0369152) и 1-пропанола (WO 2014/0369152). В дополнение к одному или большему количеству целевых продуктов микроорганизм по данному изобретению может также продуцировать этанол, ацетат и/или 2,3-бутандиол. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения микробная биомасса сама по себе может считаться продуктом.

"Нативный продукт" представляет собой продукт, который продуцируется генетически немодифицированным микроорганизмом. Например, этанол, ацетат и 2,3-бутандиол являются нативными продуктами Clostridium autoethanogenum, Clostridium ljungdahlii и Clostridium ragsdalei. "Ненативный продукт" представляет собой продукт, который продуцируется генетически модифицированным микроорганизмом, но не продуцируется генетически немодифицированным микроорганизмом, из которого получен генетически модифицированный микроорганизм.

"Селективность" относится к соотношению продуцирования целевого продукта к продуцированию всех продуктов ферментации, которые продуцируются микроорганизмом. Микроорганизм по данному изобретению может быть сконструирован для продуцирования продуктов с определенной селективностью или с минимальной селективностью. В одном варианте осуществления данного изобретения целевой продукт составляет по меньшей мере 5, 10, 15, 20, 30, 50 или 75% всех продуктов ферментации, продуцируемых микроорганизмом по данному изобретению. В одном варианте осуществления данного изобретения целевой продукт составляет по меньшей мере 10% всех продуктов ферментации, продуцируемых микроорганизмом по данному изобретению, вследствие чего микроорганизм по данному изобретению имеет селективность для целевого продукта по меньшей мере 10%. В другом варианте осуществления данного изобретения целевой продукт составляет по меньшей мере 30% всех продуктов ферментации, продуцируемых микроорганизмом по данному изобретению, вследствие чего микроорганизм по данному изобретению имеет селективность для целевого продукта по меньшей мере 30%.

Термины "повышение эффективности", "повышенная эффективности" и т.п. включают в себя, но не ограничиваются ими, увеличение удельной скорости роста, скорости продуцирования или объема продукта, объема продукта на объем потребляемого субстрата или селективности продукта. Эффективность можно измерить относительно характеристик родительского микроорганизма, из которого получен микроорганизм по данному изобретению.

Термины "продуктивность" или "скорость продуцирования" представляют собой объемный выход продукта. В непрерывных системах объемный выход продукта рассчитывается как отношение концентрации стационарного состояния продукта и времени отстаивания жидкости. В периодических системах объемный выход продукта рассчитывается как концентрация и время, необходимые для получения указанной концентрации в периодической системе. Объемный выход продукта регистрировали как г/л/сут.

Как правило, культивирование осуществляли в биореакторе. Термин "биореактор" включает в себя устройство для культивирования/ферментации, состоящее из одного или большего количества сосудов, стоек или системы трубок, например, проточный химический реактор с мешалкой (ПХМР), реактор иммобилизованных клеток (РИК), реактор с орошаемым слоем (РОС), барботажная колонна, газлифтный ферментер, статический смеситель или другой сосуд или другое устройство, подходящее для контакта газ-жидкость. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения биореактор может содержать первый реактор роста и второй реактор культивирования/ферментации. Субстрат может помещен в один или оба из этих реакторов. В данном контексте термины "культивирование" и "ферментация" применяются взаимозаменяемо. Эти термины охватывают как фазу роста, так и фазу биосинтеза продукта в процессе культивирования/ферментации.

Как правило, культуру обычно поддерживают в водной культуральной среде, которая содержит питательные вещества, витамины и/или минералы, необходимые для роста определенного микроорганизма. Предпочтительно водная культуральная среда представляет собой анаэробную среду для микробного роста, такую как минимальная анаэробная среда для микробного роста. Подходящие среды хорошо известны в данной области техники.

Культивирование/ферментацию желательно проводить в подходящих условиях для продуцирования целевого продукта. Как правило, культивирование/ферментацию проводят в анаэробных условиях. Рассматриваемые условия реакции включают в себя давление (или парциальное давление), температуру, расход газа, скорость потока жидкости, pH среды, окислительно-восстановительный потенциал среды, скорость перемешивания (при применении проточного химического реактора с мешалкой), уровень инокулята, максимальные концентрации газового субстрата для обеспечения того, что газ в жидкой фазе не становится предельным, а также максимальные концентрации продукта во избежание ингибирования продукта. В частности, скорость введения субстрата может контролироваться для обеспечения того, что концентрация газа в жидкой фазе не станет предельной, поскольку продукты могут потребляться культурой в условиях предельного газа.

Эксплуатация биореактора при повышенных показателях давления позволяет увеличить скорость переноса газовой массы из газовой фазы в жидкую фазу. Соответственно, как правило, предпочтительно осуществлять культивирование/ферментацию при показателях давления выше атмосферного. Кроме того, поскольку данная скорость конверсии газа частично зависит от времени удерживания субстрата, а время удерживания определяет требуемый объем биореактора, применение систем под давлением может

значительно уменьшить объем необходимого биореактора и, следовательно, снизить капитальные затраты на оборудование для культивирования/ферментации. Это, в свою очередь, означает, что время удерживания, определяемое как объем жидкости в биореакторе, деленное на скорость потока входного газа, может быть уменьшено, когда биореакторы поддерживаются при повышенном давлении, а не при атмосферном давлении.

Оптимальные условия реакции будут частично зависеть от конкретного применяемого микроорганизма. Однако в целом предпочтительнее управлять ферментацией при давлении выше атмосферного. Кроме того, поскольку данная скорость конверсии газа частично зависит от времени удерживания субстрата, а достижение желаемого времени удерживания, в свою очередь, определяет требуемый объем биореактора, применение систем под давлением может значительно уменьшить объем необходимого биореактора и, следовательно, снизить капитальные затраты на оборудование для ферментации.

Целевые продукты могут быть отделены или очищены от ферментационной среды с помощью любого способа или комбинации способов, известных в данной области техники, включая, например, фракционную перегонку, испарение, испарение через полупроницаемую мембрану, отдувку газом, разделение фаз и экстракционную ферментацию, включая, например, экстракция жидкости жидкостью. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения целевые продукты извлекают из ферментационной среды путем непрерывного удаления части среды из биореактора, отделения микробиологических клеток от среды (удобно путем фильтрации) и извлечения одного или большего количества целевых продуктов из среды. Спирты и/или ацетон можно извлечь, например, путем перегонки. Кислоты можно извлечь, например, путем адсорбции на активированном угле. Отдельные микробные клетки предпочтительно возвращают в биореактор. Не содержащий клеток пермеат, оставшийся после удаления целевых продуктов, также предпочтительно возвращают в биореактор. Дополнительные питательные вещества (такие как витамины группы B) можно добавить в пермеат, не содержащий клеток, для пополнения среды до ее возвращения в биореактор.

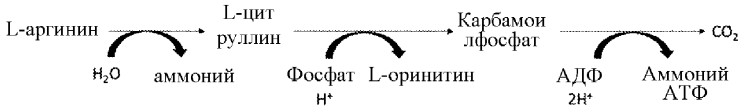
Термин "кислота", "кислоты" и т.п., когда речь идет о добавлении "кислоты" в культуру или биореактор в соответствии с данным изобретением, широко применяется в данном документе и включает в себя любые монокарбоновые и дикарбоновые кислоты. Поэтому ссылку на добавление или продуцирование эквивалентных следует применять для включения ссылки на кислоту или смесь. Например, ссылку на термин "ацетат" следует применять, чтобы включить уксусную кислоту и наоборот. Отношение молекулярной кислоты к карбоксилату в ферментационной среде зависит от pH системы. Примеры кислот включают в себя уксусную кислоту, пропионовую кислоту, n-масляную кислоту, n-пентановую кислоту, n-гексановую кислоту и бензойную кислоту.

В настоящем изобретении предлагаются способы повышения эффективности ферментации. Авторы изобретения обнаружили, что добавление определенных аминокислот в количестве, превышающем потребности клеток к микробной культуре, оказывает существенное влияние на рост культуры. Кроме того, авторы изобретения указали, что это избыточное добавление аминокислот позволяет увеличить продукцию продуктов ферментации, особенно продуктов ферментации с высокими потребностями в энергии/АТФ.

В настоящем изобретении предлагаются способы повышения эффективности ферментации. Авторы изобретения обнаружили, что добавление аргинина в количестве, превышающем потребности клеток к микробной культуре, оказывает существенное влияние на рост культуры. Кроме того, авторы изобретения указали, что это избыточное добавление аргинина позволяет увеличить продукцию продуктов ферментации, особенно продуктов ферментации с высокими потребностями в энергии/АТФ.

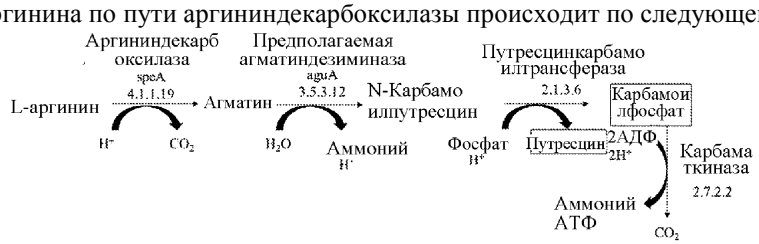
Не желая быть связанными теорией, полагают, что эффект повышения скорости роста при добавлении аргинина является результатом продукции АТФ при катаболизме аргинина микроорганизмом. Аргинин катаболизируется либо по пути аргининдезиминазы (ADI), либо по пути аргининдекарбоксилазы.

Катаболизм аргинина посредством аргининдезиминазы происходит по следующему механизму:



Катаболизм аргинина по пути ADI приводит к продуцированию аммония, CO_2 и АТФ.

Катаболизм аргинина по пути аргининдекарбоксилазы происходит по следующему механизму:



Полученная в результате катаболизма аргинина продукция АТФ позволяет увеличить профиль роста микроорганизма.

Не желая быть связанными теорией, авторы полагают, что хотя катаболизм аргинина обеспечивает потребности микроорганизма в АТФ для своего роста, аргинин не используется в качестве источника углерода микроорганизмом, скорее используемый источник углерода является углеродным компонентом С1-содержащего газа.

Способы микробной ферментации С1-содержащих газообразных субстратов для получения продуктов, таких как этанол и ацетат, широко известны в данной области техники. Такие способы обеспечивают средство для продуцирования коммерчески выгодных видов топлива из газов промышленных отходов, содержащих источники углерода С1. Как правило, эти процессы обычно включают подачу газообразного субстрата, содержащего, например, CO, в биореактор, содержащий культуру по меньшей мере одного ацетогенного карбоксидотрофного микроорганизма в жидкой питательной среде. Газообразный субстрат подвергают анаэробной ферментации с целью продуцирования спиртов, кислот и их смесей. Жидкая питательная среда, применяемая в биореакторе, как правило, содержит различные питательные вещества, которые поддерживают рост по меньшей мере одного ацетогенного карбоксидотрофного микроорганизма и используются в метаболических путях одного или большего количества микроорганизмов для продуцирования спиртов. Примеры таких питательных веществ включают в себя MgCl, CaCl, KCl, H_3PO_4, Fe, Ni, Zn, Mn, B, W, Se и т.д.

Также известно, что штаммы Clostridium могут быть генетически модифицированы с целью обеспечения продуцирования ряда других полезных продуктов, включая сукцинат, метилэтилкетон (MEK), 2-бутанол, пропандиол, 2-пропанол, изопропанол, изопрен, ацетоин, изобутанол, цитрамалат, бутадиен, а также полимолочную кислоту, ацетон, бутанол, изобутилен, 3-гидроксипропионат (3HP) и жирные кислоты.

Неожиданно авторами был обнаружен тот факт, что увеличение концентрации аргинина, добавляемого в микробную культуру, повышает профиль роста микроорганизма и увеличивает количество АТФ-емких продуктов, которые могут продуцироваться указанной культурой.

Один из вариантов осуществления данного изобретения включает в себя добавление в жидкую питательную среду аргинина, при этом количество аргинина, содержащегося в жидкой питательной среде, превышает потребности клетки С1-фиксирующего микроорганизма. Добавление аргинина в количестве, превышающем потребности клетки С1-фиксирующего микроорганизма, приводит к увеличению удельной скорости роста микробной культуры. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения удельная скорость роста С1-фиксирующего микроорганизма увеличивается по меньшей мере на 10%, или по меньшей мере на 20%, или по меньшей мере на 30%, или по меньшей мере на 40%, или по меньшей мере на 50%, или по меньшей мере на 60%, или по меньшей мере на 70% по сравнению с микроорганизмом без избытка аргинина.

Потребность в аргинина клеток микроорганизма можно оценить путем определения аминокислотного состава биомассы после гидролиза биомассы и анализа аминокислот.

Было продемонстрировано, что при увеличении концентрации аргинина в жидких питательных средах от концентрации, эквивалентной потребности клеток, до концентрации, превышающей 1000 раз (или более) потребности для синтезе биомассы, время удвоения микроорганизма уменьшалось. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения время удвоения культуры, получаемое при избытке аргинина, уменьшалось до 3,5 ч по сравнению с временем удвоения в 7,3 ч в культуре без избытка аргинина. Не желая быть связанными теорией, авторы также полагают, что увеличение концентрации аргинина в 2-80 раз (или более) выше потребности клеток повышает объем выхода АТФ-емких продуктов ферментации. В некоторых вариантах данного изобретения аргинин добавляют в культуру в количестве, превышающем потребности для синтеза биомассы от 2 до 1000 раз, или от 2 до 800 раз, или от 2 до 500 раз, или от 2 до 100 раз, или от 2 до 50 раз, или от 2 до 10 раз, или от 50 до 1000 раз, или от 50 до 800 раз, или от 50 до 600 раз, или от 50 до 500 раз, или от 50 до 300 раз, или от 50 до 200 раз, или от 50 до 100 раз, или от 100 до 1000 раз, или от 100 до 800 раз, или от 100 до 600 раз, или от 100 до 500 раз, или от 100 до 300 раз, или от 100 до 200 раз.

Что касается фактической концентрации, то среди широкого спектра вариантов осуществления данного изобретения представлен вариант, в котором концентрация аргинина в жидкой питательной среде составляет от 20 мг/л до 20 г/л. В конкретных вариантах осуществления данного изобретения концентрация аргинина поддерживается на уровне по меньшей мере 20 мг/л, или по меньшей мере 100 мг/л, или по меньшей мере 300 мг/л, или по меньшей мере 500 мг/л, или по меньшей мере 1 г/л, или по меньшей мере 2 г/л, или по меньшей мере 3 г/л, или по меньшей мере 4 г/л, или по меньшей мере 5 г/л, или по меньшей мере 10 г/л, или по меньшей мере 20 г/л. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения концентрация аргинина поддерживается на уровне от 20 мг/л до 20 г/л, или от 100 мг/л до 20 г/л, или от 500 мг/л до 20 г/л, или от 500 мг/л до 10 г/л, или от 1 до 10 г/л, или от 5 до 10 г/л, или от 5 до 20 г/л. В определенном варианте осуществления данного изобретения аргинин добавляют в культуру таким образом, что потребление аргинина культурой составляет по меньшей мере 20 мг аргинина на грамм сухого веса клеток, или по меньшей мере 100 мг аргинина на грамм сухого веса клеток, или по меньшей мере 1 г аргинина на грамм сухого веса клеток, или по меньшей мере 5 г аргинина на грамм сухого веса клеток, или по меньшей мере 10 г аргинина на грамм сухого веса клеток. В некоторых вариантах осуще-

ствления данного изобретения аргинин добавляют в культуру таким образом, что потребление аргинина культурой составляет от 20 мг до 20 г/г сухого веса клеток, или от 100 мг до 20 г/г сухого веса клеток, или от 1 до 10 г/г сухого веса клеток.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения по меньшей мере 0,012 г аргинина потребляется культурой для получения 1 г биомассы. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения потребность клеток в аргинине для синтеза биомассы составляет от 0,012 г/г биомассы до 24 г/г биомассы. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения потребность в аргинине для синтеза биомассы составляет по меньшей мере 0,012 г/г биомассы, или по меньшей мере 0,024 г/г биомассы, до 0,048 г/г биомассы, или по меньшей мере 0,120 г/г биомассы, или по меньшей мере 0,24 г/г биомассы, или по меньшей мере 0,48 г/г биомассы, или по меньшей мере 1,2 г/г биомассы, или по меньшей мере 2,4 г/г биомассы, или по меньшей мере 4,8 г/г биомассы, или по меньшей мере 12 г/г биомассы.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения увеличение концентрации аргинина в жидкой питательной среде от 2 до 80 раз (или более) выше потребности клеток увеличивает время удвоения микроорганизма по меньшей мере на 10%, или по меньшей мере на 20%, или по меньшей мере на 30%, или по меньшей мере на 40%, или по меньшей мере на 50%, или по меньшей мере на 60%, или по меньшей мере на 70%.

Когда концентрацию аргинина увеличивали до концентрации, которая была выше потребности клеток Clostridium autoethanogenum, продуцирование ацетата микроорганизмом снижалось. Не желая быть связанными теорией, авторы полагают, что способность Clostridium autoethanogenum использовать аргинин с целью продуцирования АТФ для роста сводит к нулю необходимость микроорганизма продуцировать ацетат для усвоения АТФ при добавлении аргинина.

Описаны все ацетогенные микроорганизмы с продуцированием ацетата (Drake, Ацетогенные прокариоты, в "Прокариоты", 3-е издание, с. 354-420, New York, NY, Springer, 2006), поскольку продуцирование ацетата дает микроорганизму возможность напрямую генерировать АТФ в результате фосфорилирования субстрата посредством Pta (фосфотрансацетилаза) и Ack (фосфотрансацетилаза-ацетаткиназа). В частности, в промышленном масштабе нежелательно, чтобы микроорганизмы продуцировали ацетат (или другие органические кислоты, необходимые для реакции КоА-трансферазы) в качестве побочного продукта, поскольку ацетат отводит углерод от целевых продуктов и таким образом влияет на эффективность и объем продуцирования целевых продуктов. Кроме того, ацетат может быть токсичным для микроорганизмов и/или может служить в качестве субстрата для роста контаминирующих микроорганизмов. Также присутствие ацетата затрудняет извлечение и разделение целевых продуктов и контроль условий ферментации в пользу продуцирования целевых продуктов.

Добавление аргинина в количестве, превышающем клеточные потребности культуры Clostridium autoethanogenum, приводит к значительному уменьшению продуцирования ацетата по сравнению с культурой, в которую аргинин не добавляют в количестве, превышающем потребности клеток. Кроме того, авторы продемонстрировали, что продуцирование ацетата увеличивается в культуре, в которой источник аргинина полностью истощен. В одном варианте осуществления данного изобретения добавления избытка аргинина в микробную культуру уменьшает продуцирование ацетата на 20, или 30, или 40, или 50, или 60, или 70, или 80%.

Авторы изобретения продемонстрировали, что аргинин стехиометрически превращается в орнитин, вовлекаясь в путь аргининдезиминазы как механизм катаболизма аргинина. Этот путь превращает аргинин в орнитин, аммоний, АТФ и CO_2. Усилению роста будет способствовать поставка АТФ и аммония в результате расщепления аргинина. В одном варианте осуществления данного изобретения предлагается способ повышения устойчивости процесса ферментации, при этом аргинин добавляют в микробную культуру в отсутствие альтернативного источника азота.

В данной области техники хорошо известно, что для роста микроорганизма необходим азот. Как правило, азот добавляют в культуру в виде аммониевой соли или гидроксида аммония. Как правило, аммиак получают в результате процесса Хабера, который характеризуется следующей реакцией:

$$N_2(г) + 3H_2(г) \rightleftharpoons 2NH_3(г) \quad \Delta H^{\ominus} = -92 \text{ кДж моль}^{-1}$$

В настоящее время аммиак продуцируется в основном из природного газа и угля. В типичном способе продуцирования аммиака из природного газа водород поступает из природного газа, а азот получают из атмосферы. Природный газ продуцирует парниковые газы, поэтому, хотя сам аммиак не продуцирует парниковых газов, продуцирование аммиака происходит способствует этому. Желательным является обнаружение и использование источников аммиака, которые являются полностью возобновляемыми. (http://www.agmrc.org/renewable_energy/renewable_energy/ammonia-as-a-transportation-fuel/). Стоимость гидроксида аммония (от 28,0 до 30,0 мас./мас.) определяется в диапазоне 9600 долларов США за 1000 кг.

Аргинин (L-аргинин) впервые выделили из экстракта проростков люпина в 1886 г. Позднее было установлено, что он широко распространен в пищевых продуктах и кормах. Аргинин можно получить различными способами, включая гидролиз белков, химический синтез и микробиологический синтез. Большую часть L-аргинина получают путем прямой ферментации с использованием возобновляемых

источников углерода (Jn.nutrition.org/content/134/10/2854S.full).

Выявленный путь по примеру 3 позволяет превратить 1 моль аргинина в 3 моля аммиака. Таким образом, аргинин может обеспечить альтернативный источник азота для бактерий, обеспечивая наличие аммиака непосредственно в метаболизме, сохраняя при этом преимущества, описанные выше. Поскольку 1 молекула аргинина может быть разбита на 3 молекулы аммиака, более низкие требуемые количества приведут к значительной экономии затрат в результате более дешевой стоимости аргинина (стоимость 99% аргинина пищевой ценности составляет около ~17-18 тыс. долларов США/1000 кг, в то время как стоимость 30% промышленного аммиака составляет ~10-11 тыс. долларов США/1000 кг от Sigma Aldrich или Fisher) и обусловят упрощенное обращение. Кроме того, аргинин может быть получен устойчивым из биологических источников, например, путем ферментации (T. Utagawa, J. Nutr., 2004, 134, 2854S-2857).

Путь аргининдезиминазы осуществляется посредством трех ферментативных стадий, катализируемых аргининдезиминазой (EC 3.5.3.6), карбомилтрансферазой (орнитинкарбомилтрансферазой, путресцинкарбомилтрансферазой) (EC 2.1.3.3) и карбаматкиназой (EC 2.7.2.2). Соответствующие ферменты были идентифицированы в геноме C. autoethanogenum.

В другом аспекте данного изобретения дополнительно предлагается генетически сконструированная C1-фиксирующая бактерия, содержащая оптимизированный путь аргининдезиминазы. В одном варианте осуществления данного изобретения предлагается генетически сконструированная C1-фиксирующая бактерия, содержащая один или большее количество ферментов, выбранных из группы, состоящей из аргининдезиминазы (EC 3.5.3.6), карбомилтрансферазы (орнитинкарбомилтрансферазы, путресцинкарбомилтрансферазы) (EC 2.1.3.3) и карбаматкиназы (EC 2.7.2.2), при этом каждый фермент представляет собой сверхэкспрессированный эндогенный фермент, мутированный эндогенный фермент или экзогенный фермент. В конкретных вариантах осуществления данного изобретения C1-фиксирующая бактерия представляет собой бактерию Clostridium. В конкретных вариантах осуществления данного изобретения бактерия представляет собой Clostridium autoethanogenum.

Не желая быть связанными теорией, авторы полагают, что для повышения эффективности пути, в частности, если наблюдается накопление промежуточных соединений, например цитрулина, любым специалистом в данной области техники соответствующие гены могут быть сверхэкспрессированы или гены из других источников могут быть введены и гетерологично экспрессированы с помощью способов, описанных ранее (WO 2012/053905, WO 2012/115527, WO 2013/180584).

В данном изобретении дополнительно предлагается способ продуцирования по меньшей мере одного продукта из субстрата, при этом указанный способ включает в себя культивирование генетически сконструированной C1-фиксирующей бактерии, содержащей один или большее количество ферментов, выбранных из группы, состоящей из аргининдезиминазы (EC 3.5.3.6), карбомилтрансферазы (орнитинкарбомилтрансферазы, путресцинкарбомилтрансферазы) (EC 2.1.3.3) и карбаматкиназы (EC 2.7.2.2), при этом каждый фермент представляет собой сверхэкспрессированный эндогенный фермент, мутированный эндогенный фермент или экзогенный фермент.

В другом аспекте данного изобретения дополнительно предлагается генетически сконструированная C1-фиксирующая бактерия, содержащая один или большее количество ферментов, выбранных из группы, состоящей из орнитинрацемазы (EC 5.1.1.12), орнитинаминомутазы (EC 5.4.3.5), 2,4-диаминопентаноатдегидрогеназы (EC 1.4.1.12) и 2-амино-4-оксопентаноаттиолазы. Не желая быть связанными теорией, авторы полагают, что любым специалистом в данной области техники соответствующие гены могут быть сверхэкспрессированы или гены из других источников могут быть введены и гетерологично экспрессированы с помощью способов, описанных ранее (WO 2012/053905, WO 2012/115527 и WO 2013-180584). Организм также может быть адаптирован и сформирован для более эффективного использования орнитина, если он является адаптированным к аргинину для роста в динамике. Это подтверждается наблюдаемым накоплением орнитина.

Авторы идентифицировали репрессор аргинина, который контролирует экспрессию гена путем связывания с палиндромной операторной последовательностью, которая расположена примерно на 45 п.о. выше стартового кодона аргининдезиминазы. Добавление аргинина приводит к тому, что репрессор отвязывает операторную последовательность, что обеспечивает транскрипцию генов в направлении 3'-операторной последовательности. В одном аспекте данного изобретения предлагается генетически сконструированная рекомбинантная бактерия, содержащая по меньшей мере один гетерологичный ген, при этом указанный гетерологичный ген вводят в направлении 3'-argR-связывающей операторной последовательности, при этом генная экспрессия по меньшей мере одного гетерологичного гена может быть активирована посредством добавление аргинина.

В данном изобретении также предлагается способ продуцирования по меньшей мере одного продукта, при этом указанный способ включает в себя добавление источника углерода в культуру содержащей генетически сконструированную бактерию, содержащую по меньшей мере один гетерологичный ген, при этом указанный гетерологичный ген вводят в направлении 3'-argR-связывающей операторной последовательности, обеспечивая культуру аргинином и осуществляя ферментацию культуры. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения по меньшей мере один гетерологичный ген является гетерологичным геном в пути биосинтеза указанного продукта.

В одном примере гетерологичные гены могут кодировать метаболический путь, для которого необходим АТФ для синтеза продукта. Например, мевалонатный путь представляет собой гетерологичный путь, который превращает ацетил-КоА в изопентенилдифосфат при стоимости 3 молей АТФ, равной стоимости моля изопентенилдифосфата. С помощью описанного способа экспрессию гетерологичного мевалонатного пути можно активировать добавлением аргинина, который также будет обеспечивать АТФ для мевалонатного пути путем расщепления аргинина посредством пути аргининдезиминазы.

В другом аспекте аргинин может быть использован посредством пути декарбоксилирования аргинина. Не желая быть связанными теорией, авторы считают, что аргинин может быть декарбоксилирован в агматин и CO_2 с помощью фермента аргининдекарбоксилазы. Агматин может быть затем превращен в N-карбамоил-путресцин с помощью фермента агматиндезиминазы, с получением также аммония. N-карбамоил-путресцин плюс фосфат может быть превращен в путресцин плюс карбамоилфосфат с помощью фермента путресцинкарбамоилтрансферазы. Карбамоилфосфат плюс АДФ превращается в аммоний+АТФ+CO_2 с помощью карбаматкиназы по тому же механизму, что и в пути аргининдезиминазы. Чистый выход аммония и АТФ является таким, что и в пути аргининдезиминазы, но с двумя другими промежуточными продуктами (агматин и N-карбамоил-путресцин) и другим побочным продуктом (путресцин). Путресцин является побочным продуктом большей ценности, чем орнитин или аргинин, и может быть использован в качестве исходного сырья для продуцирования различных полимеров, включая нейлон-4,6 (Qian et al., 2009, Biotechnol. Bioeng, 104, с. 651-662) и полиуретан.

В другом аспекте бактерия является модифицированной для сверхэкспрессии одного или большего количества эндогенных генов, экспрессии еще одного мутированного эндогенного гена или гетерологичной экспрессии одного или большего количества экзогенных генов, кодирующих ферменты, выбранные из группы, состоящей из орнитинрацемазы, орнитинаминомутазы, субъединицы бета (OraE), орнитинаминомутазы, субъединицы альфа (OraS), 2,4-диаминопентаноатдегидрогеназы, 2,4-диаминопентаноатдегидрогеназы, 2-амино-4-оксопентаноаттиолазы, субъединицы бета, 2-амино-4-оксопентаноаттиолазы, субъединицы альфа и функционально эквивалентных им вариантов. В альтернативном варианте бактерию можно модифицировать с целью экспрессии одного или большего количества экзогенных генов, выбранных из группы, состоящей из орнитинрацемазы, орнитинаминомутазы, субъединицы бета (OraE), орнитин-аминомутазы, субъединицы альфа (OraS), 2,4-диаминопентаноатдегидрогеназы, 2,4-диаминопентаноатдегидрогеназы, 2-амино-4-оксопентаноаттиолазы, субъединицы бета, и 2-амино-4-оксопентаноаттиолазы, субъединицы альфа. В предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения эндогенные гены являются производными от Clostridium sticklandii (фиг. 23). Не желая быть связанными теорией, авторы полагают, что при экспрессии этих генов результаты приведут к повышению эффективности в пути аргининдезиминазы, особенно когда в родительском штамме накопление наблюдается орнитина. В альтернативном варианте считается, что бактерия может быть адаптирована и сформирована для более эффективного использования орнитина. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения бактерию выбирают для роста на аргинине.

В другом аспекте бактерия содержит одну или большее количество генетических модификаций, которые разрушают транспортер аргинина:орнитина. В одном варианте осуществления данного изобретения генетическая модификация нарушает экспрессию CAETHG3023 и CAETHG3024 (Genbank GeneID: 17336441 и 17336442, номера доступа к белку Genbank: YP_008700482.1 и YP_008700483.1). Предпочтительно, генетическая модификация представляет собой нокаутную мутацию гена. Нокаут транспортера аргинина:орнитина приводит к уменьшению экспорта орнитина из бактериальной клетки и способствует метаболизму орнитина клеткой. Кроме того, бактерию можно модифицировать с целью экспрессии альтернативного транспортера аргинина для импорта аргинина без экспорта орнитина. В альтернативных вариантах осуществления данного изобретения бактерию можно модифицировать с целью экспрессии импортера орнитина, чтобы обеспечить повторный захват экскретируемого орнитина. Каждый из этих подходов повысит способность бактерии метаболизировать орнитин.

Пример 1 демонстрирует продуцирование аланина из аргинина микроорганизмом C. autoethanogenum. В одном аспекте данного изобретения предлагается способ продуцирования одного или большего количества продуктов, производных от аланина, продуктов, производных от аланина, включая 3-гидроксипропионат (3-HP) или акриловую кислоту. Акриловая кислота является важным промышленным продуктом и используется в полимерных флокулянтах, диспергаторах, покрытиях, красках, клеях и связующих материалах для кожи, бумаги и текстиля с оцениваемым мировым спросом, составляющим в 2014 г. 5 млн т. 3-HP представляет собой платформу для акриловой кислоты, метилакриловой кислоты, акриламида или 1,3-пропандиола.

В одном аспекте данного изобретения предлагается генетически сконструированная C1-фиксирующая бактерия, содержащая по меньшей мере один гетерологичный фермент, выбранный из группы, состоящей из ферментов для превращения аланина в малонилсемиальдегид и 3-HP, ферментов для превращения аланина в аланил-КоА, ферментов для превращения 3-HP в акрилил-КоА, ферментов для превращения аланил-КоА в акрилил-КоА и ферментов для превращения акрилил-КоА в акрилат.

В конкретных вариантах осуществления данного изобретения C1-фиксирующий микроорганизм представляет собой ацетогенный карбоксидотрофный микроорганизм. Примеры подходящих

C1-фиксирующих микроорганизмов включают в себя Clostridium, Moorella, Oxobacter, Peptostreptococcus, Acetobacterium, Eubacterium или Butyribacterium. В различных вариантах осуществления данного изобретения микроорганизм выбирают из группы микроорганизмов, указанных в табл. 4.

Примеры

Следующие примеры дополнительно иллюстрируют данное изобретение, но, разумеется, не должны толковаться как ограничивающие каким-либо образом сферу его применения.

Таблица 1

Среда PETC-MES, не содержащая экстракта дрожжей

Компонент	**Количество на 1 л среды**
NH_4Cl	1 г
KCl	0,1 г
$MgSO_4.7H_2O$	0,2 г
KH_2PO_4	0,2 г
$CoCl_2$	0,02 г
2-(*N*-морфолино)этансульфоновая кислота (MES)	20 г
Ацетат натрия	0,1 г
Fe (SO_4) x $7H_2O$	0,05 г
Нитрилотриуксусная кислота	0,05 г
Ресазурин (маточный раствор 2 г/л)	0,5 мл
Раствор микропримеси металла (см. ниже)	10 мл
Витаминный раствор Вулфа (см. ниже)	10 мл
Раствор восстанавливающего агента 1 (см. ниже)	5 мл
Раствор восстанавливающего агента 2 (см. ниже)	5 мл
pH 5,6	Регулируется с помощью 4N NaOH

Раствор микропримеси металла	**на 1000 мл маточного раствора**
Нитрилотриуксуная кислота	2 г
$MnSO_4.H_2O$.	1 г
Fe (SO_4) x $7H_2O$	0,56 г
$CaCl_2.6H_2O$	0,2 г
$ZnSO_4.7H_2O$	0,2 г
$CuCl_2.2H_2O$	0,02 г
$NaMoO_4.2H_2O$	0,02 г
Na_2SeO_3 x $5H_2O$	0,03 г
$NiCl_2.6H_2O$	0,02 г
$Na_2WO_4.2H_2O$	0,02 г
pH 7,6	Регулируется с помощью 5M KOH
Витаминный раствор Вулфа	**на 1000 мл маточного раствора**
Биотин	2 мг
Фолиевая кислота	2 мг
Пиридоксина гидрохлорид	10 мг
Тиамин.HCl	5 мг
Рибофлавин	5 мг
Никотиновая кислота	5 мг
Кальций D-(+)-пантотенат	5 мг
Витамин B_{12}	0,1 мг
4-аминобензойная кислота	5 мг
Тиоктовая кислота	5 мг
Восстанавливающий агент 1 (хранение в анаэробных условиях, в темноте)	**на 100 мл маточного раствора**
L-цистеин-HCl	4 г
Восстанавливающий агент 2 (хранение в анаэробных условиях, в темноте)	**на 100 мл маточного раствора**
NaOH	0,9 г (растворяют сначала)
L-цистеин-HCl	4 г (растворяют после NaOH)
Na_2S * 9 H_2O	4 г (растворяют после цистеина)

Таблица 2

Составы аминокислот с конечными концентрациями в г/л

Аминокислота	20АК	8АК	14АК	12АК	4АК	Аргинин
Триптофан	0,004		0,017			
Тирозин	0,069					
Треонин	0,022	0,088	0,088	0,176		
Валин	0,062	0,246	0,246	0,246		
Пролин	0,024					
Аланин	0,029					
Аргинин	0,011	0,044	0,044	0,881	0,881	5,000
Аспарагиновая кислота	0,010	0,076	0,076	0,761	0,761	
Аспарагин	0,009					
Цистеин	0,067		0,453	0,905		
Гистидин	0,011	0,042	0,042	0,849	0,849	
Изолейцин	0,026		0,105	0,105		
Глутамінова кислота	0,009	0,034	0,034	0,690	0,690	
Глутамин	0,009		0,035			
Глицин	0,033					

Пример 1. Идентификация предпочтительных аминокислот ацетоногенного C. autoethanogenum и увеличение темпов роста при добавлении аргинина.

Этот пример демонстрирует, что аргинин, гистидин, аспартат и глутамат являются особенно предпочтительными по сравнению с другими аминокислотами и потребляются при более чем 80-кратных количествах, чем это необходимо для синтеза биомассы ацетоногенным C. autoethanogenum DSM10061, а добавление аргинина в определенную среду позволяет C. autoethanogenum расти с tD ~3 ч, что в 3 раза быстрее по сравнению со средой с добавлением дрожжевого экстракта (YE).

Clostridium autoethanogenum DSM 10061 получали из DSMZ (Немецкая коллекция микроорганизмов и клеточных культур, Inhoffenstraße 7 B, 38124 Braunschweig, Германия).

Бездрожжевую среду PETC-MES дополняли различными аминокислотными составами: 20АК, 7АК, 8АК, 14АК, 12АК, 4АК и аргинином (табл. 2) - для определения того, являются ли какие-либо аминокислоты поддерживающими рост. Растворы стерилизовали фильтрованием и делали бескислородными путем барботирования N2.

Прежде всего среду 20АК разрабатывали на основе аминокислотной композиции биомассы Clostridium acetobutylicum (Lee et al. 2008) с конечными концентрациями аминокислот, теоретически поддерживающими продуцирование 1 г DCW/л биомассы.

Исследования роста проводили при серийном культивировании в объеме 50 мл среды в флаконах 125 мл с сывороткой с применением азота в свободном пространстве при встряхивании (если не указано иначе) при 37°C. Оптическую плотность (ОП) измеряли при 600 нм с показанием ~0,5 вне анаэробной камеры по сравнению с полностью окисленной средой в качестве эталона.

Органические кислоты, фруктозу и аминокислоты, анализировали с помощью ВЭЖХ. Количественный анализ органических кислот, углеводов и спиртов проводили с помощью ион-эксклюзионной хроматографии с использованием системы HPLC Agilent 1200 и колонки Agilent Hiplex H (300×7,7 мм, PL1170-6830) с защитной колонкой (SecurityGuard Carbo-H, Phenomenex PN: AJO -4490). Как правило, содержание сахаров и спиртов контролировали с применением детектора коэффициента преломления (Agilent RID, G1362A), установленного на положительной полярности и температуре оптического блока 40°C, в то время как содержание органических кислот контролировали при 210 нм (Agilent MWD, G1365B) и/или с применением детектора коэффициента преломления. 30 мкл образца вводили на колонку с применением автоматического дозатора (Agilent HiP-ALS, G1367B) и температуру колонки поддерживали при 65°C с помощью термостатируемого отделения колонки (Agilent TCC, G1316A). Аналиты элюировали изократически с применением 4 мМ H_2SO_4 при 0,6 мл/мин в течение 26 мин. Фруктозу, сахарозу и глюкозу анализировали отдельно при температуре колонки 15°C и с применением воды высокой степени чистоты (18,2 МП·см) в качестве подвижной фазы и элюировали изократически со скоростью 0,4 мл/мин в течение 21 мин. Хроматограммы интегрировали с помощью ChemStation (Dietmair S., Timmins N.E., Gray P.P., Nielsen L.K., Kromer J.O., К количественной метаболомике клеток млекопитающих: разработка протокола извлечения метаболитов, Analytical biochemistry, 2010, 404:155-164). Содер-

жание аминокислот анализировали и количественно определяли, как описано ранее (R.B. McQualter, C. Bellasio, L.K. Gebbie, L.A. Petrasovits, R.W. Palfreyman, M.P. Hodson, M.R. Plan, D.M. Blackman, S.M. Brumbley, L.K. Nielsen, Plant. Biotechnol. J., 2015).

Несмотря на то что максимальная ОП, достигнутая на среде 20АК, была немного ниже (~20%), чем на дрожжевом экстракте, наблюдался одинаково быстрый рост (время удвоения tD≅9ч, скорость роста (μ=0,077) в начале ввода проб (фиг. 1).

Анализ АК неожиданно продемонстрировал предпочтительное и быстрое использование средами АК аспартата, глутамата, серина, гистидина и треонина (фиг. 2). Запасы аргинина в среде быстро истощались. Что более важно, серии и треонин потреблялись в более чем 6-кратном, а аспартат, глутамат, гистидин и аргинин - в более чем 20-кратном количестве, чем это необходимо для продуцирования биомассы, что указывает на их использование для других целей, чем включение в биомассу. Примечательно, что накопление аланина вместо его потребления наблюдали на обеих средах во время роста. Исходя из этих результатов следующие среды с концентрациями выше в 2 и 4 раза были сконструированы так, чтобы получить более минимальную среду, более быстрый рост и более высокую ОП: среда 14АК путем исключения шести АК не потребляла вообще или потребляла медленно, а среда 8АК путем восстановления аминокислот дополнительно.

В среде 14АК с 4-кратным увеличением концентрации АК была достигнута более высокая максимальная ОП по сравнению с ростом на дрожжевом экстракте (фиг. 3). Важно отметить, что максимальная ОП, достигнутая на среде 8АК, соответствует показателю среды 20АК, демонстрирующему, что более минимальный состав АК может поддерживать хороший рост. Увеличение концентрации АК положительно сказалось на времени удвоения: более быстрый и эквивалентно быстрый рост был достигнут на средах 14АК и 8АК соответственно по сравнению с дрожжевым экстрактом и средой 20АК (фиг. 4).

Анализ АК подтвердил предыдущие результаты и еще раз подчеркнул важность АК аспартата, глутамата, гистидина и аргинина (фиг. 5 и 6). Примечательно, что аргинин был наиболее предпочтительной аминокислотой, поскольку он истощался уже при ОП=0,24. Среди других АК, серии и треонин использовались более быстро. Опять же на обеих средах наблюдалось значительное накопление аланина. Представляет интерес тот факт, что орнитин также продуцировался. Аспартат, глутамат, гистидин и аргинин потреблялись в более чем 10-кратном количестве, чем это необходимо для продуцирования биомассы, что указывает на их использование для выработки энергии.

Исходя из этих результатов две следующие среды были разработаны для получения более быстрого роста: среда 12АК путем исключения глутамина и триптофана из среды 14АК и увеличения концентраций серина, треонина и цистеина в 8 раз, и среда, состоящая только из 4 идентифицированных АК: аспартата, глутамата, гистидина и аргинина - с 80-кратным увеличением концентраций по сравнению с средой 20АК (увеличение в 2 и 20 раз по сравнению со средой 14АК); среда 4АК, содержащая только "4 верхних АК" аспартата, глутамата, гистидина и аргинина с 80-кратным увеличением концентраций по сравнению со средой 20АК.

Конструкция среды 4АК поддерживала более высокую максимальную ОП по сравнению со средой 12АК и соответствовала максимальной ОП, полученной на дрожжевом экстракте и среде 20АК (фиг. 7). В обеих средах 4АК и 12АК быстрый рост - tD ~2,5 ч - измерялся до ОП ~0,3, после чего рост замедлялся. Важно отметить, что достигнутое tD ~2,5 ч в 4 раза быстрее по сравнению с добавлением 1 г/л дрожжевого экстракта, что обычно применяется.

Быстрый начальный рост с последующим замедлением объясняется истощением аргинина. Из данных анализа АК среды 12АК видно, что аргинин является предпочтительной АК, и полностью истощается при ОП=0,37 (фиг. 8). Эти данные также указывают на то, что аргинин сильно стимулировал рост вместе с глутаматом, аспартатом и гистидином, поддерживая tD ~2,5 ч, что было измерено в диапазоне ОП от 0,1 до 0,3, в то время как рост замедлялся после истощения аргинина в диапазоне ОП от 0,3 до 0,37. Наблюдалось одновременное накопление орнитина. Опять же было обнаружено значительное накопление аланина.

Замедление роста после истощения аргинина также проявлялось в среде 4АК (фиг. 9). Во время катаболизма аргинина, кроме орнитина, было обнаружено также накопление цитруллина. В дополнение к накоплению аланина в первый раз небольшие количества (~0,3 мМ) накопленного лизина и валина, а также неизвестный пик (время удерживания 8,3 мин) продемонстрировали увеличение площадей пиков.

Поскольку первоначальный быстрый рост был неожиданным, для расчета tD можно было использовать только пару образцов. Таким образом, устройство мониторинга биомассы BugLab было прикреплено к флакону с сывороткой на среде 4АК с целью осуществления непрерывного мониторинга увеличение биомассы до истощения аргинина в среде. Этот эксперимент подтвердил быстрый рост на 4АК до истощения аргинина, поскольку tD было рассчитано как ~2 ч (фиг. 10).

Даже добавление аргинина приводило к очень хорошему росту с эквивалентно высокой максимальной ОП, как на среде 4АК, так и на дрожжевом экстракте. Рост C. autoethanogenum DSM10061 в бездрожжевой среде PETC-MES с 5 г аргинина/л+5 г фруктозы/л приводил к быстрому начальному росту на ранней этапе (tD ~3 ч) с последующим более медленным ростом на втором этапе после истощения арги-

нина (tD ~40 ч) (фиг. 11).

Неожиданно было обнаружено, что во время начальной фазы быстрого роста образовывалось небольшое количество ацетата. Продуцирование ацетата опять же связано с ростом во второй, более медленной фазе роста (фиг. 12).

На фиг. 13 продемонстрировано быстрое использование аргинина. В дополнение к накоплению аланина, небольшие количества (~0,5 мМ) лизина и валина были получены аналогично среде 4АК. Тот же самый неизвестный пик (время удерживания 8,3 мин), наблюдаемый на среде 4АК, продемонстрировал увеличение площади пиков после истощения аргинина.

С целью получения более точного значения tD на среде с аргинином был проведен эксперимент BugLab для непрерывного мониторинга увеличения биомассы до расхода аргинина. Этот эксперимент подтвердил быстрый рост до расхода аргинина, поскольку значение tD было рассчитано как ~3 ч (фиг. 14). Более быстрый рост аргинина по сравнению с экстрактом дрожжей продемонстрирован на фиг. 15.

Пример 2. Усиление аутотрофного роста при добавлении аргинина.

Этот пример демонстрирует повышенную удельную скорость роста и меньшее количество продуцируемого ацетата для ацетогенного Clostridium autoethanogenum DSM 23693 при аутотрофном росте с добавлением аргинина.

Clostridium autoethanogenum DSM 23693 (дериват Clostridium autoethanogenum DSM 10061; патент США 2013/0217096) был получен из DSMZ (Немецкая коллекция микроорганизмов и клеточных культур, Inhoffenstraße 7 B, 38124 Braunschweig, Германия).

Рост осуществляли в среде PETC-MES без дрожжевого экстракта (табл. 1) с помощью стандартных анаэробных методов (Hungate, Meth. Microbiol., 3B:117-132, 1969; Wolfe, Adv. Microb. Physiol., 6:107-146, 1971) и применением газовой смеси $CO/CO_2/H_2$ (композиция: 50% CO, 20% CO_2, 2% H_2, 28% N_2) с давлением в свободном пространстве 22 фунта на квадратный дюйм.

Для изучения эффекта добавления аргинина к среде добавляли 5 г/л аргинина, а культуральный рост и продуцирование метаболитов при аутотрофном росте сравнивали с контролем без аргинина.

Затем анализировали рост посредством измерения оптической плотности с помощью спектрофотометра Thermo Genesys 20. Метаболиты, такие как ацетат (уксусная кислота), этанол, 2,3-бутандиол или молочную кислоту, измеряли с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на Agilent LC с детектированием коэффициента преломления (RI) при 35°C. Образцы готовили путем разбавления 400 мкл с 100 мкл раствора 5-сульфосалициловой кислоты (1% мас./об. в 1 М серной кислоте) с последующим 3-минутным центрифугированием при 14000 об/мин; супернатант переносили в стеклянный флакон для анализа. Разделение проводили с помощью ввода 10 мкл на колонку Alltech IOA-2000 (150 мм×6,5 мм×8 мкм) при 0,7 мл/мин и 65°C в изократических условиях с применением 5 мМ подвижной фазы серной кислоты.

Эксперимент проводили в двух биологических повторах с трехкратными культурами (n=3) для каждого условия в объеме 40 мл среды во флаконах Шотта 1 л при 37°C с орбитальным встряхиванием (120 об/мин, орбитальное встряхивание). В каждом случае ацетогенный штамм C. autoethanogenum DSM 23693 предварительно культивировали в PETC-MES без дрожжевого экстракта до ОП 600 нм=0,3 и для инокуляции применяли одну предварительную культуру.

В первом эксперименте соблюдались следующие условия: PETC-MES без дрожжевого экстракта+синтез-газ, 22 фунта на квадратный дюйм (исходный показатель ОП 600 нм=0,005) и PETC-MES без дрожжевого экстракта+синтез-газ, 22 фунта на квадратный дюйм+5 г аргинина/л (исходный показатель ОП 600 нм=0,005).

В повторном эксперименте культуру также инокулировали в среду с добавлением аргинина, но без добавления газа $CO/CO_2/H_2$ (100% N_2, 22 фунта на квадратный дюйм, в качестве свободного пространства). Этот эксперимент состоял из следующих трех условий: PETC-MES без дрожжевого экстракта+синтез-газ, 22 фунта на квадратный дюйм (исходный показатель ОП 600 нм=0,03), PETC-MES без дрожжевого экстракта+синтез-газ, 22 фунта на квадратный дюйм+5 г аргинина/л (исходный показатель ОП 600 нм=0,003) и PETC-MES без дрожжевого экстракта+5 г аргинина/л (исходный показатель ОП 600 нм=0,03). Среду, содержащую аргинин, инокулировали до более низкой исходной плотности, чем среда без аргинина, чтобы отразить неожиданно повышенную удельную скорость роста с аргинином, наблюдаемую в первом эксперименте.

В обоих экспериментах культуры с аргинином росли неожиданно быстро (4 удвоения менее чем за 15 ч, что соответствовало удвоению времени tD=3,5 ч и удельной скорости роста μ=0,198) до ОП 600 нм≈0,8, тогда как рост контроля был намного медленнее с удвоением времени tD=7,3 ч и удельной скоростью роста μ=0,095 (фиг. 16, 17). Следовательно, добавление аргинина уменьшало время удвоения и увеличивало удельную скорость роста культуры при аутотрофном росте более чем на 50%.

Лог-преобразованный график автотрофного роста C. autoethanogenum наглядно демонстрирует уменьшение времени удвоения в результате добавления аргинина (фиг. 18). Рассчитанное время удвоения составляло tD=7,3 ч±0,2 для аутотрофного роста без добавления аргинина и tD=3,5 ч±0,2 с добавлением аргинина, что на 52% меньше.

Как с аргинином, так и без него культура достигла той же конечной плотности при аутотрофном росте, что указывает на то, что аргинин не использовался в качестве источника углерода, а только увеличивал удельную скорость роста (фиг. 16, 17). Это было также подтверждено в культуре, в которую не поставлялся газ; в культурах, дополненных аргинином, но без газовой смеси $CO/CO_2/H_2$, не наблюдали роста в течение 48 ч (фиг. 17). Это подтверждает гипотезу о том, что аргинин не используется в качестве источника углерода в этих условиях, а скорее CO/CO_2 используется в качестве источника углерода, а АТФ обеспечивается в результате метаболизма аргинина.

Автотрофный рост ацетогенов обычно связан с образованием ацетата (уксусной кислоты), поскольку образование ацетата генерирует АТФ посредством субстратного фосфорилирования в реакции ацетаткиназы, которая необходима для роста. Как было установлено на сегодняшний день, все выделенные ацетогены продуцируют ацетат. Однако образование ацетата нежелательно с точки зрения процесса, поскольку он отводит углерод от целевых продуктов и, как известно, является токсичным для микроорганизмов уже при низких концентрациях, составляющих несколько процентов (J. Ballongue, E. Masion, J. Amine, H. Petitdemange, R. Gay, Appl. Microbiol. Biotechnol., 1987, 26, 568-573; G. Wang, D.I. Wang, Appl. Environ. Microbiol., 1984, 47, 294-8). В среде роста, дополненной 5 г аргинина/л, неожиданно не наблюдали никакого продуцирования ацетата до момента наступления паузы в росте при ОП 600 нм≈0,8 и только на этом этапе ацетат продуцировался (фиг. 19).

Результаты этого набора экспериментов подтверждают, что C. autoethanogenum может использовать аргинин с целью продуцирования АТФ для роста, и поэтому не имеет потребности продуцировать ацетат при добавлении аргинина.

Пример 3. Идентификация и оптимизация путей использования аргинина.

Этот пример демонстрирует, как аргинин обеспечивает дополнительный АТФ для клетки и может поступать в центральный метаболизм ацетогенов.

Как показано в примере 1, аргинин стехиометрически превращается в орнитин. Также в некоторые моменты времени наблюдали накопление цитруллинов. Не желая быть связанными теорией, авторы полагают, что это наблюдение подразумевает путь аргининдезиминазы в качестве существующего механизма.

Этот путь превращает аргинин в орнитин, аммоний, АТФ и CO_2. Усилению роста будет способствовать поставка АТФ и аммония в результате расщепления аргинина. Эта поставка АТФ также устраняет необходимость продуцирования ацетатов ацетогенами.

Путь аргининдезиминазы осуществляется посредством трех ферментативных стадий, катализируемых аргининдезиминазой (EC 3.5.3.6), орнитинкарбомилтрансферазой, (путресцинкарбомилтрансферазой) (EC 2.1.3.3) и карбаматкиназой (EC 2.7.2.2). В геноме C. autoethanogenum идентифицированы соответствующие ферменты (включая два гена транспортера аргинина/орнитина/фермента), орнитинкарбомилтрансфераза, причем карбаматкиназа присутствует во множестве копий (табл. 3). Ферменты, способные катализировать одни и те же реакции, также присутствуют в других организмах, включая многие ацтогены, включая C. ljungdahlii, C. scatologenes, C. drakei, а также Acetonema longum (табл. 4). Этот путь также присутствует в C. stricklandii или E.coli.

Таблица 3

Идентифицированные гены/ферменты пути аргининдезиминазы в C. autoethanogenum

Название	**Нуклеотидная последовательность (Номер доступа, ID гена в Genbank Gen, тег локуса)**	**Аминокислотная последовательность (Номер доступа, ID белка в Genbank)**
аргининдезиминаза	17336439, CAETHG_3021	AGY77224
орнитинкарбомилтрансфераза	17336440, CAETHG_3022	AGY77225
	17334022, CAETHG_0591	AGY74820
транспортер аргинина/орнитина	17336441, CAETHG_3023	AGY77226
	17336442, CAETHG_3024	AGY77227
карбаматкиназа	17336443, CAETHG_3025	AGY77228
	17333852, CAETHG_0421	AGY74650
	17333876, CAETHG_0445	AGY74674
	17337050, CAETHG_3632	AGY77835
	17335507, CAETHG_2081	AGY76300

Таблица 4

Идентифицированные гены/ферменты пути дезиминазы в других организмах

Аргининдезиминаза	
Организм	**Номер доступа**
Clostridium ljungdahlii DSM	ADK13995.1
Clostridium scatologenes	AKA70116.1
Clostridium drakei	WP_032076790.1
Propionispira raffinosivorans	WP_026329241.1
Acetonema longum	WP_040292494.1
Clostridium perfringens	WP_003479447.1
Clostridium sticklandii	WP_013361144.1
Clostridium cadaveris	WP_051196258.1
Clostridium colicanis	WP_002599585.1
Caldisalinibacter kiritimatiensis	WP_006311966.1
Caloranaerobacter azorensis	WP_035161638.1
Halothermothrix orenii	WP_012635610.1
Filifactor alocis	WP_014262361.1
Dethiosulfovibrio peptidovorans	WP_005659654.1
Aminomonas paucivorans	WP_006299755.1
Clostridiisalibacter paucivorans	WP_026893703.1
Thermanaerovibrio velox	WP_006582950.1
Thermanaerovibrio acidaminovorans	WP_012870198.1
Peptoniphilus indolicus	WP_004823213.1
Borrelia hermsii	WP_038443653.1
Borrelia hermsii YBT	AHH12878.1
Borrelia hermsii	WP_043924507.1
Borrelia hermsii HS1	AAX17338.1
Enterococcus phoeniculicola	WP_010766746.1
Vagococcus lutrae	WP_023606773.1
Borrelia hermsii	WP_025400143.1
Borrelia parkeri	WP_025375819.1
Brachyspira alvinipulli	WP_028331136.1
Borrelia persica	WP_038363688.1
Borrelia hispanica	WP_038359270.1
Borrelia coriaceae	WP_025408405.1
Borrelia turicatae	WP_011772777.1
Fervidicella metallireducens	WP_035377985.1
Carnobacterium divergens	WP_034570618.1
Borrelia crocidurae	WP_038442698.1
Borrelia duttonii	WP_038366702.1
Borrelia duttonii	WP_012538581.1
Borrelia crocidurae	WP_014696655.1
Thermobrachium celere	WP_018660497.1
Enterococcus faecalis	WP_048941938.1
Enterococcus faecalis CBRD01	ESU74366.1
Borrelia recurrentis	WP_012539214.1
Caloramator sp. ALD01	WP_027308491.1
Enterococcus faecalis	WP_002410400.1
Caloramator australicus	WP_008907964.1
Atopobacter phocae	WP_025729241.1
Clostridium sulfidigenes	WP_035132876.1
Borrelia anserina	WP_025419989.1
Tetragenococcus halophilus	WP_014125833.1
Enterococcus haemoperoxidus	WP_010761089.1
Streptococcus marimammalium	WP_018369865.1
Tetragenococcus muriaticus	WP_038024314.1
Enterococcus gallinarum	WP_029486596.1
Clostridium dakarense	WP_042277345.1
Borrelia miyamotoi	WP_020955199.1
Thermoanaerobacterium aotearoense	WP_014757694.1
Streptococcus parauberis	WP_003104748.1
Enterococcus casseliflavus	WP_010748983.1
Clostridium botulinum	WP_011987187.1
Streptococcus porcinus	WP_003083226.1
Enterococcus casseliflavus	WP_005230691.1
Borrelia miyamotoi	WP_025443390.1
Thermoanaerobacterium xylanolyticum	WP_013786994.1
	WP_008087965.1
Streptococcus ictaluri	WP_007892646.1
Streptococcus pseudoporcinus	WP_017413713.1

Clostridium tunisiense	
Орнитинкарбомилтрансфераза	
Организм	**Номер доступа**
Clostridium ljungdahlii	WP_013239445.1
Propionispira raffinosivorans	WP_019552618.1
Clostridium scatologenes	WP_046066002.1
Acetonema longum	WP_004092025.1
Clostridium senegalense	WP_010298035.1
Clostridium argentinense	WP_039635916.1
Clostridium argentinense	WP_039634993.1
Candidatus Cloacimonas acidaminovorans	WP_015423864.1
Clostridium senegalense	WP_010293963.1
Clostridium botulinum	WP_041345924.1
Staphylococcus haemolyticus	WP_053016198.1
Clostridium tunisiense	WP_017413712.1
Staphylococcus simulans	WP_023016208.1
Clostridium sporogenes	WP_058009868.1
Staphylococcus haemolyticus	WP_053030082.1
Staphylococcus carnosus	WP_012664052.1
Staphylococcus epidermidis	WP_049386361.1
Staphylococcus carnosus	WP_053464819.1
Clostridium drakei	WP_032079337.1
Staphylococcus capitis	WP_002452600.1
Bacillus rubiinfantis	WP_042357582.1
Staphylococcus carnosus	WP_046100679.1
Staphylococcus aureus	WP_031891031.1
Lactobacillus rennini	WP_057873389.1
Staphylococcus microti	WP_044360832.1
Streptococcus agalactiae	WP_000793624.1
Lactobacillus parabrevis	WP_020089358.1
Карбаматкиназа	
Организм	**Номер доступа**
Clostridium scatologenes	WP_029954845.1
Clostridium drakei	WP_032079746.1
Clostridium argentinense	WP_039633500.1
Clostridium carbonicivorans	WP_007061333.1
Clostridium drakei	WP_032075357.1
Clostridium scatologenes	WP_029162276.1
Thermoanaerobacter thermocopriae	WP_028991790.1
Thermoanaerobacter mathranii	WP_013149923.1
Thermoanaerobacter italicus	WP_012994659.1
Caldanaerobacter subterraneus	WP_022588163.1
Caldanaerobacter subterraneus	WP_011024959.1

Acetonema longum	WP_004092029.1
Thermoanaerobacter siderophilus	WP_006569095.1
Гипотетический белок [Propionispira raffinosivorans	WP_019552620.1
Thermoanaerobacter thermocopriae	WP_054644772.1
Thermoanaerobacter wiegelii	WP_014062398.1
Thermoanaerobacter kivui	WP_049684636.1
Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum	WP_013298601.1
Caldisalinibacter kiritimatiensis	WP_006311968.1
Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum	WP_015312281.1
Eubacterium nodatum	WP_034819233.1
Thermanaerovibrio velox	WP_006584132.1
Thermanaerovibrio acidaminovorans	WP_012869022.1
Aminiphilus circumscriptus	WP_026369063.1
Clostridium argentinense	WP_039635912.1
Anaerovorax odorimutans	WP_027398659.1
Thermoanaerobacterium xylanolyticum	WP_013787463.1
Clostridium aerotolerans	WP_026892136.1
Fervidicella metallireducens	WP_035377990.1
Clostridium argentinense	WP_039636739.1
Clostridium senegalense	WP_010298030.1
Clostridium sphenoides	WP_054791734.1
Клостридиальный бактериальный оральный таксон 876	WP_021654611.1
Clostridium perfringens	WP_025648248.1
Clostridium sp. KNHs214	WP_035294990.1
Clostridium perfringens	WP_003457589.1
Thermoanaerobacterium aotearoense	WP_014759446.1
Clostridium celerecrescens	WP_038281265.1
Alkaliphilus metalliredigens	WP_049765320.1
Clostridium botulinum	WP_024932088.1
Clostridium algidicarnis	WP_029453364.1
Clostridium botulinum	WP_012669533.1
Clostridium drakei	WP_032077363.1
Clostridium sticklandii	WP_013361146.1

Для повышения эффективности пути, в частности, если наблюдается накопление промежуточных продуктов в виде цитрулинов, соответствующие гены могут быть сверхэкспрессированы или гены из других источников могут быть введены и гетерологично экспрессированы любым специалистом в данной области техники с помощью способов, описанных ранее (US 2013/344547, US 2013/330809, US 2013/323820, US 2013/224838, US 2013/224839, US 2011/256600, US 2011/236941).

Сам орнитин может быть далее преобразован в аланин, который, как было продемонстрировано, накапливается также, как и в примере 1. Это превращение также генерирует дополнительные восстановительные эквиваленты НАДФ (Н), а также другую молекулу аммиака и ключевой строительный блок ацетил-КоА из КоА.

Как проиллюстрировано на фиг. 23, превращение орнитина в аланин и ацетил-КоА происходит с помощью ферментативных стадий с участием орнитинрацемазы (EC 5.1.1.12), орнитинаминомутазы (EC 5.4.3.5), 2,4-диаминопентаноатдегидрогеназы (EC 1.4.1.12) и 2-амино-4-оксопентаноаттиолазы (EC 2.3.1.B10). Соответствующие ферменты описаны, например, из Clostridium sticklandii или образцов природной среды, при этом гомологи были идентифицированы в C. autoethanogenum (табл. 5).

Таблица 5

Идентифицированные гены/ферменты орнитина к пути превращения аланина и ацетил-КоА из C. sticklandii или образцов природной среды и гомологи C. autoethanogenum

Название	**Нуклеотидная последовательность (Номер доступа, ID гена в Genbank Gen, тег локуса)**	**Аминокислотная последовательность (Номер доступа, ID белка в Genbank)**
орнитинрацемаза	9854830, CLOST_1288	CBH21408
орнитинаминомутаза, субъединица бета (OraE)	9854831, CLOST_1290 17333626, CAETHG_0193	CBH21410 AGY74426
орнитинаминомутаза, субъединица альфа (OraS)	9856217, CLOST_1291	CBH21411
2,4-диаминопентаноатдегидрогеназа	CU695246	CAQ42978.1
2-амино-4-оксопентаноаттиолаза, субъединица бета	CU695248	CAQ42980.1
2-амино-4-оксопентаноаттиолаза, субъединица альфа	CU695247	CAQ42979.1

Для повышения эффективности пути, в частности, если наблюдается накопление орнитина, любым специалистом в данной области техники соответствующие гены C. autoethanogenum могут быть сверхэкспрессированы или гены из C. sticklandii или образцов природной среды по табл. 5 могут быть введены и гетерологично экспрессированы с помощью способов, описанных ранее (WO 2012/053905, WO 2012/115527, WO 2013/180584). Организм также может быть адаптирован и сформирован для более эффективного использования орнитина, если он является адаптированным к аргинину для роста в динамике.

Для получения метаболического потока в путь также может потребоваться нокаут транспортера аргинина:орнитина (CAETHG3023-24), чтобы предупредить выход орнитина из клетки. Такие нокауты могут осуществляться любым специалистом в данной области техники с помощью способов, описанных ранее (WO 2012/053905, WO 2012/115527 и WO 2013/180584). Также может понадобиться добавление альтернативного транспортера аргинина. Альтернативным подходом к нокауту транспортера аргинина:орнитина может быть введение импортера орнитина, следовательно, орнитин может быть метаболизирован дополнительно.

Идентифицированные пути были также смоделированы в реконструкции масштабной модели генома, чтобы продемонстрировать эффект метаболизма и подтвердить идентифицированные пути.

Реконструкцию метаболизма в масштабной модели генома для C. autoethanogenum создавали на основе опубликованных способов (L.-E. Quek, L.K. Nielsen, Genome Inform., 2008, 21, 89-100; C.G. de Oliveira Dal'Molin, L.-E. Quek, R.W. Palfreyman, S.M. Brumbley, L.K. Nielsen, Plant Physiol., 2010, 152, 579-89; C. Licona-Cassani, E. Marcellin, L.-E. Quek, S. Jacob, L.K. Nielsen, Antonie Van Leeuwenhoek, 2012, 102, 493-502.). Ядро масштабной модели генома реконструировали с применением аннотационного магистрального конвейера модели SEED (C.S. Henry, M. DeJongh, A.A. Best, P.M. Frybarger, B. Linsay, R.L. Stevens, Nat. Biotechnol., 2010, 28, 977-82). Реконструкция сохранила все атрибуты реакции от модели SEED, включая уникальные реакции, составные идентификаторы и обратимость реакций. Модель заполняли гэпами вручную в Excel (Microsoft Corporation) для упрощения аннотирования и комментирования, в частности, центральный метаболизм и определенные выше пути использования аргинина специально отбирали в ручном режиме. Из этой ген-ориентированной базы данных генерировали репрезентативную 2D-ориентированную реакцию SBML (System Biology Markup Language, http://www.sbml.org) с помощью приложения Java (Oracle Corporation). Реконструкцию и анализ на основе ограничений выполняли с помощью инструментария COBRA (http://opencobra.sourceforge.net/) (J. Schellenberger, R. Que, R.M. T. Fleming, I. Thiele, J.D. Orth, A.M. Feist, D.C. Zielinski, A. Bordbar, N.E. Lewis, S. Rahmanian, J. Kang, D.R. Hyduke, B.O. Palsson, Nat. Protoc., 2011, 6, 1290-307). Набор сценариев для моделирования на основе ограничений выполняли в среде MATLAB. Анализ баланса метаболического потока (Orth et al., 2010) применяли для расчета основных питательных веществ для роста, а анализ скрытой оценки проводили для исследования положительного эффекта аминокислот (АК) на Clostridium autoethanogenum и определения того, какие АК оказывают наибольшее влияние на продуцирование АТФ. Анализ баланса метаболического потока (АБП) применяли для расчета основных питательных веществ для роста (Fan et al., 2014; Song et al., 2008); анализировали эффекты добавления АК синтез целевого продукта (Licona-Cassani et al., 2012) и в сочетании с анализом (Hillier и Lieberman, 2010) скрытой цены определяли субстраты, оказывающие наибольшее влияние на продуцирование АТО (Teusink et al., 2006).

Обычный анализ скрытой цены может быть некорректным с АК. Если анализ скрытой цены проводится в условиях автотрофии (т.е. при нулевом поглощении), он покажет альтернативные издержки синтеза АК, т.е. ресурсы, которые могут быть высвобождены, если данная АК была добавлена в среду. Самый дорогой синтез АК не обязательно является лучшим субстратом для продуцирования АТФ. Например, может быть недоступным какой-либо путь расщепления.

Чтобы преодолеть эту проблему, был выполнен анализ коррекции скрытой цены. Для каждой из 20 АК был доступен максимальный поток 1,4 ммоль/г DCW/ч при максимизации объема получения биомассы. Этот поток представляет собой наблюдаемую максимальную удельную скорость поглощения фруктозы микроорганизмом C. autoethanogenum DSM 10061 во время предварительных экспериментов по изучению роста на стандартной среде PETC-MES (включая дрожжевой экстракт (YE)) и фруктозу. АК с отсутствием пути расщепеления не могут использовать максимально допустимый поток и, следовательно, будут иметь нулевую скрытую цену. Анализ скрытой цены выявил девять АК: глутамин, гистидин (HIS), цистеин (CYS), треонин, аспартат (ASP), аргинин (ARG), глицин, серии и глутамат (GLU) - из обычных 20, которые C. autoethanogenum должен предпочесть, поскольку они приводят к более быстрому росту.

Прогнозирование АК на основе модели было подтверждено на среде 20АК для восьми из девяти ожидаемых АК (фиг. 2) за исключением лишь глицина. Примечательно, что поглощение ASP, GLU, HIS и ARG на единицу биомассы было более чем в 20 раз выше, чем необходимо для синтеза биомассы. Поглощение АК на грамм биомассы сравнивали с ожидаемой концентрацией в биомассе (потребность клеток) на основе измерений, проведенных в Clostridium acetobutylcium (Lee et al., 2008).

Неожиданно было обнаружено, что на дополнительно разработанной среде 12АК поглощение ASP, GLU, HIS и ARG было более чем в 120 раз выше, чем требуется для синтеза биомассы, и что указанные аминокислоты могут значительно ускорить рост. Это указывает на потенциальное участие ASP, GLU, HIS и ARG в генерации энергии. Представляет интерес тот факт, что одновременно с потреблением аргинина в фазе быстрого роста было обнаружено накопление орнитина (фиг. 8), указывающее на потенциальное участие пути аргининдезиминазы (ADI) в обеспечении клеток дополнительным АТФ. Следует отметить, что показатель первоначально наблюдаемого быстрого роста (tD=2,5±0,1 ч) очень близок к рассчетному росту с 20 АК (tD=2,9 ч).

Представляет интерес тот факт, что более низкое продуцирование ацетата на единицу биомассы наблюдали в средах, содержащих ASP, GLU, HIS и ARG (среда 4АК) (8,2±0,2 ммоль/г DCW), и в среде, содержащей только аргинин (среда ARG) (6,7±0,7 ммоль/г DCW), в которой аргинин находился в избытке по сравнению со средой с дрожжевым экстрактом (36,6 ммоль/г DCW). Продуцирование ацетата сильно увеличивалось после истощения аргинина (46,5±11,2 и 34,5±9,3 ммоль/г DCW для среды 4АК и среды ARG соответственно), демонстрируя, что возможность катаболизировать аргинин сильно снижает необходимость продуцировать ацетат ацетогеном.

Гетеротрофные культуры C. autoethanogenum, выращенные на среде 12АК, накапливали орнитин одновременно с потреблением аргинина (фиг. 8). То же самое наблюдали в экспериментах в биореакторе со средой 4АК, и средой, содержащей только аргинин, с высокой долей (около 60%) потребленного углерода, выделяемого в виде орнитина (фиг. 22A, 22B). Кроме того, обнаруживали значительный углеродный поток к CO_2, а также заметное накопление цитруллина. Другие менее значительные побочные продукты включали ацетат, аланин и этанол. В целом значительные углеродные потоки к орнитину, CO_2, и цитруллину указывают на то, что аргинин катаболизировался по пути ADI, объясняя его эффект, усиливающий рост, поставкой АТФ (фиг. 21). Кроме того, полное стехиометрическое превращение аргинина в орнитин, CO_2, и цитруллин предполагает, что аргинин метаболизировался строго для выработки энергии, а не для синтеза биомассы. Это согласуется с результатом, демонстрирующим отсутствие роста и наблюдаемым при добавлении только аргинина к бездрожжевым средам PETC-MES, содержащим флаконы Шотта под давлением газа N_2

Вовлечение пути ADI в содействие более быстрому росту прогнозировалось при первичном моделировании в силиконе на среде 4АК и на среде, содержащей только аргинин. Расчетная общая удельная скорость продуцирования АТФ ($q_{АТФ}$; ммоль АТФ/г DCW/ч) была примерно в 6 раз выше в последних условиях (SIM 4 и 5) по сравнению с расчетами для фруктозы (SIM 1) в качестве единственного источника углерода (табл. 6). То же самое наблюдалось, когда модель была ограничена экспериментально определяемым поглощением субстрата и скоростью секреции продукта (исключая цитруллин и CO_2) в экспериментах в биореакторе на среде 4АК (SIM 6 и 9) и на среде, содержащей только аргинин (SIM 12 и 15), с показателем $q_{АТФ}$ примерно в 3-4 раза выше по сравнению с расчетным показателем исключительно для среды с фруктозой. Наблюдаемый более быстрый рост (tD ~3-4 ч) на средах с АК по сравнению с расчетным ростом на средах без добавления АК (tD ~14 ч) можно объяснить значительно более высоким уровнем продуцирования энергии в результате субстратного фосфорилирования при катаболизме аргинина (карбаматкиназный путь ADI) и косвенно генерацией протонной движущей силы в результате продуцирования и выведения NH_4^+. Последнее также полезно для снижения стоимости биопроцесс благодаря уменьшенной надобности нейтрализовывать pH при добавлении NH_4OH.

Таблица 6

Модельный расчет для прогнозируемой удельной скорости роста, скорости продуцирования АТФ и продуктов при гетеротрофном росте с добавлением аргинина и без добавления аргинина

	SIM 1	**SIM 4**	**SIM 5**	**SIM 6**	**SIM 7**	**SIM 9**	**SIM 10**	**SIM 12**	**SIM 13**	**SIM 15**	**SIM 16**
Удельная скорость поглощения субстрата (ммоль/г DCW/ч)											
Фруктоза	1,40	1,40	1,40	1,99	1,99	1,48	1,48	1,43	1,43	1,40	1,40
Аспартат	0,00	1,40	0,00	0,76	0,76	0,85	0,85	0,00	0,00	0,00	0,00
Гистидин	0,00	1,40	0,00	0,13	0,13	0,41	0,41	0,00	0,00	0,00	0,00
Глутамат	0,00	1,40	0,00	0,63	0,63	0,63	0,63	0,39	0,39	0,00	0,00
Цистеин	0,00	1,40	1,40	3,95	3,95	2,09	2,09	1,30	1,30	1,06	1,06
Аргинин	0,00	10,00	10,00	19,11	19,11	13,10	13,10	10,22	10,22	11,99	11,99
Удельная скорость выделения продукта (ммоль/ г DCW/ч)											
Ацетат	3,15	35,97	28,15	2,03	55,01	1,97	37,78	1,38	28,47	1,14	31,77
Этанол	0,00	0,00	0,00	0,89	0,00	0,82	0,00	0,97	0,00	0,65	0,00
Диоксид углерода	0,11	9,06	5,38	22,51	13,75	15,58	9,82	11,45	6,56	12,48	7,16
Орнитин	0,00	0,00	0,00	19,10	0,00	12,71	0,00	9,49	0,00	11,02	0,00
Аланин	0,00	0,00	0,00	0,89	0,00	0,71	0,00	0,66	0,00	0,69	0,00
Лактат	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Цитруллин	0,00	0,00	0,00	1,05	0,00	0,81	0,00	0,45	0,00	0,46	0,00
2,3-бутандиол	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2-оксобутарат	0,00	0,00	0,00	0,48	0,00	0,27	0,00	0,03	0,00	0,00	0,00
Формамид	0,00	1,38	0,00	0,11	0,09	0,39	0,38	0,00	0,00	0,00	0,00
Удельная скорость роста ($ч^{-1}$)	0,05	0,28	0,17	0,25	0,54	0,24	0,43	0,19	0,31	0,19	0,32
Общая удельная скорость продуцирования АТФ (ммоль/г DCW/ч)	**6,80**	**45,57**	**38,55**	**34,81**	**72,08**	**23,82**	**49,11**	**18,92**	**37,70**	**20,83**	**42,40**

Быстрый рост и низкий синтез ацетата, реализуемый при добавлении аргинина, имеет значение для индустрии биотехнологий, поскольку уменьшение потока углерода в нежелательный побочный продукт ацетата и получение дополнительного АТФ из альтернативных путей имеет важное значение для расширения спектра продуктов ацетогенов.

Масштабные модели генома могут применяться для оценки внутриклеточных метаболических потоков и расчета углеродных, окислительно-восстановительных и энергетических балансов путем ограничения модели экспериментально измеренными данными (Bordbar et al., 2014; Dash et al., 2016; O'Brien et al., 2015). Использовали масштабную модель метаболизма генома C. autoethanogenum, аналогичную той, которая описана Marcellin (Низкоуглеродное топливо и химические вещества из отработанных газов - Системный подход к пониманию энергетического метаболизма в модели ацетоногена, Green Chem, 2016). Анализ масштабной модели генома авторы выполняли для гетеротрофных экспериментов на среде АК и на среде, содержащей только аргинин, путем осуществления аналитических расчетов баланса потока, как описано выше. Модель дополнительно была ограничена удельной скоростью поглощения субстрата и скоростью секреции продукта (исключая цитруллин и CO_2), а также показателем tD для клеток. Максимизацию рассеяния АТФ (т.е. неучтенные затраты АТФ, см. ниже) применяли в качестве целевой функции для выполнения АБП (при этом не учитывались затраты на поддержание энергии).

Быстрый рост на среде 4АК и среде ARG обеспечивался примерно в 3-4 раза большим показателем $q_{АТФ}$ (29,3±5,5 и 19,9±1,0 ммоль АТФ/г DCW/ч для среды 4АК и среды ARG соответственно (SIM 6 и 9; и SIM 12 и 15 в табл. 6), по сравнению с показателем 6,8 ммоль АТФ/г DCW/ч, рассчитанным для роста исключительно на фруктозе (SIM 1). Авторы считают, что более быстрый рост, наблюдаемый на среде 4АК по сравнению со средой ARG, объясняется в 2 раза большим удельным потоком благодаря АТФ-продуцирующей ацетаткиназной реакции (фиг. 24). Однако на обеих средах ~53% АТФ продуцировалось посредством пути ADI (фиг. 24), что свидетельсвует о том, что катаболизм аргинина полностью

реорганизовал энергетический обмен. Представляет интерес тот факт, что хотя потребление аргинина благоприятствует многим бактериям (Abdelal, 1979; Adamberg et al., 2006; Lahtvee et al., 2011; Mehmeti et al., 2011), его вклад в продуцирование энергии является вариабельным.

Проанализирован также прогнозируемый профиль оптимального потока при гетеротрофном росте на фруктозе и АК. При ограничении модели экспериментально измеренными показателями скорости поглощения субстрата и неучтенными затратами АТФ, рассчитанными ранее, и максимизацией для выхода биомассы, эти расчеты прогнозировали более быстрый рост (среда 4АК tD=1,4±0,2 ч, SIM 7 и 10; среда ARG tD=2,2±0,1 ч, SIM 13 и 16) по сравнению с показателями, которые были получены в эксперименте (tD=2,8±0,1 ч и tD=3,7±0,0 ч соответственно). Кроме того, в моделях орнитин, продуцируемый во время катаболизма аргинина, катаболизировался в GLU, демонстрируя, что дальнейшее метаболизирование орнитина посредством описанного выше орнитинового пути является возможным. Прогнозируемый более быстрый рост, таким образом, происходит в результате катаболизма GLU до пирувата посредством метиласпартатного пути (как отмечено выше) и его дальнейшего превращения в ацетил-КоА и ацетат, что приводит к уменьшению Fd и АТФ.

Пример 4. Рост на среде с аргинином в качестве единственного источника азота.

Этот пример демонстрирует замещение аммония в качестве источника азота на аргинин.

Азот является важным питательным веществом для бактерий, а аммоний обычно используется в ферментативных реакциях, а также в качестве источника азота в составах сред для ацетогенов, известных из литературных данных (M. Köpke, C. Held, S. Hujer, H. Liesegang, A. Wiezer, A. Wollherr, A. Ehrenreich, W. Liebl, G. Gottschalk, P. Durre, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 2010, 107, 13087-92; J. Mock, Y. Zheng, A.P. Mueller, S. Ly, L. Tran, S. Segovia, S. Nagaraju, M. Köpke, P. Dürren, R.K. Thauer, J. Bacteriol, 2015, 197, 2965-2980; H. Richter, M.E. Martin, L.T. Angenent, Energies, 2013, 6, 3987-4000; J.L. Cotter, M.S. Chinn, A.M. Grunden, Bioprocess Biosyst. Eng., 2009, 32, 369-80; M. Straub, M. Demler, D. Weuster-Botz, P. Dürre, J. Biotechnol., 2014.). Тем не менее продуцирование аммония зависит от обильных поставок энергии, преимущественно природного газа или сжиженных нефтяных газов (СНГ) посредством процесса Хабер-Бош (www.essentialchemicalindustry.org/chemicals/ammoinia.html) и, следовательно, аммоний не является устойчивым источником. Кроме того, ионы аммония влияют на pH при ферментации.

Выявленный путь по примеру 3 позволяет превратить 1 моль аргинина в 3 моля аммиака. Таким образом, аргинин может обеспечить альтернативный источник азота для бактерий, обеспечивая наличие аммиака непосредственно в метаболизме, сохраняя при этом преимущества, описанные выше. Поскольку 1 молекула аргинина может быть разбита на 3 молекулы аммиака, более низкие требуемые количества приведут к значительной экономии затрат в результате более дешевой стоимости аргинина (стоимость 99% аргинина пищевой ценности составляет около ~17-18 тыс. долларов США/1000 кг, в то время как стоимость 30% промышленного аммиака составляет ~10-11 тыс. долларов США/1000 кг от Sigma Aldrich или Fisher) и обусловят упрощенную обработку. Кроме того, аргинин может быть получен устойчивым из биологических источников, например, путем ферментации (T. Utagawa, J. Nutr., 2004, 134, 2854S-2857).

Чтобы продемонстрировать, что аргинин можно использовать в качестве единственного источника азота для ацетогена Clostridium autoethanogenum DSM 23693, организм выращивали на бездрожжевой среде PETC-MES, не применяя 1 г/л хлорида аммония (NH_4Cl) с 0,33 г/л несинтетического моногидрохлорида L-аргинина (Sigma Aldrich; A6969).

Пример 5. Добавление аргинина приводит к увеличению продуцирования не встречающихся в природе продуктов из гетерологичных путей, в частности путей потребления АТФ.

Этот пример демонстрирует, что добавление аргинина увеличивает продуцирование не встречающихся в природе из гетерологичных путей.

Продуцирование нескольких не встречающихся в природе было продемонстрировано в ацетогенах из газа (WO 2012053905, WO 2012115527, WO 2013180584, WO 2013185123, WO 2013191567). Как правило, некоторый уровень ацетата наблюдается в качестве побочного продукта, поскольку организм вырабатывает АТФ в результате субстратного фосфорилирования посредством ацетаткиназной реакции. Это, в частности, случай для путей, которым необходим АТФ, например, но не ограничиваясь ими, пути продуцирования изопрена или других терпеноидов (мевалонатный путь) или пути продуцирования продуктов, производных от жирной кислоты, таких как биодизель (посредством биосинтеза жирных кислот). Однако это также относится к другим путям ферментации, которые непосредственно не требуют АТФ, но также не дают такого же количества АТФ на ацетил-КоА, как образование ацетата, например, но не ограничиваясь ими, пути продуцирования изопропанола, ацетона, бутанола (посредством пути ABE).

Продуцирование изопропанола из газа моделировали с применением анализа баланса потока (АБП) в масштабной моделью генома C. autoethanogenum (как описано в примере 3). К модели добавляли гетерологичные пути (табл. 3) и моделирование на максимальный теоретический выход проводили с добавлением аргинина и без добавления аргинина (табл. 4).

Таблица 7

Гетерологичные пути

Мевалонатный путь и изопренсинтаза	
Название	**уравнение**
тиолаза	2 Ацетил = КоА <=> КоА + Ацетоацетил = КоА
3-HMG-КоА-синтаза	(S) = 3 = гидрокси = 3 = метилглутарил = КоА + КоА <=> Ацетил = КоА + ацетоацетил = КоА
3-HMG-КоА-редуктаза (НАДН)	(R) = мевалонат + КоА + 2 НАД + <=> (S) = 3 = гидрокси = 3 = метилглутарил = КоА + 2 НАДН
3-HMG-КоА-редуктаза-редуктаза (НАДФН)	(R) = мевалонат + КоА + 2 НАДФ + <=> (S) = 3 = гидрокси = 3 = метилглутарил = КоА + 2 НАДФН
Мевалонаткиназа (АТФ)	ATP + (R) = мевалонат => ADP + (R) = 5 = фосфомевалонат
Мевалонаткиназа (CTP)	CTP + (R) = мевалонат => CDP + (R) = 5 = фосфомевалонат
Мевалонаткиназа (GTP)	GTP + (R) = мевалонат => GDP + (R) = 5 = фосфомевалонат
Мевалонаткиназа (UTP)	UTP + (R) = мевалонат => UDP + (R) = 5 = фосфомевалонат
Фосфомевалонаткиназа	АТФ + (R) = 5 = фосфомевалонат => ADP + (R) = 5 = дифосфомевалонат
Дифосфомевалонатдекарбоксилаза	АТФ + (R) = 5 = Дифосфомевалонат => ADP + ортофосфат + изопентенил_дифосфат + CO2
Изопентенилдифосфат Дельта-изомераза	Изопентенил_дифосфат <=> Диметилаллил_дифосфат
Изопренсинтаза	Диметилаллил_дифосфат => Изопрен + PP
Транспорт изопрена	Изопрен (cyt) => Изопрен (ext)
изопропанольный путь	
Название	**уравнение**
тиолаза	2 Ацетил = КоА <=> КоА + Ацетоацетил = КоА
КоА-трансфераза	Ацетоацетил = КоА + ацетат <=> Ацетоацетат + ацетил-КоА
ацетоацетатдекарбоксилаза	Ацетоацетат => Ацетон + CO2
вторичная алкогольдегидрогеназа	Ацетон + НАДФН => Изопропанол
транспорт изопропанола	Изопропанол (cyt) => Изопропанол (ext)

Таблица 8

АБП-анализ максимальных теоретических объемов продуцирования целевых продутов изопрена или изопропанола из CO и CO_2/H_2 с добавлением аргинина и без добавления аргинина в ммоль/г DW/ч

Целевой продукт	**CO** **60 ммоль CO/г DW/ч**		
	Продукт	**Ацетат**	**Этанол**
Изопропанол	5,061008	0	2,408488
Изопрен	1,967815	2,209201	3,935631

Целевой продукт	**CO + аргинин** **60 ммоль CO + 2 ммоль аргинина /г DW/ч**		
	Продукт	**Ацетат**	**Этанол**
Изопропанол	6,41679498	0	2,041474197
Изопрен	2,576176316	2,254853944	4,152352632

Целевой продукт	**CO + аргинин** **48 ммоль CO + 2 ммоль аргинина /г DW/ч**		
	Продукт	**Ацетат**	**Этанол**
Изопропанол	5,404593388	0	1,559776585
Изопрен	2,182613259	1,813013818	3,365226517

Целевой продукт	CO2/H2 60 ммоль CO2/H2/ г DW/ ч		
	Продукт	Ацетат	Этанол
Изопропанол	5,00758257	0	2,408488
Изопрен	1,26220128	2,209201	3,935631

Целевой продукт	CO2/H2 + аргинин 60 ммоль CO2/H2 + 2 ммоль аргинина /г DW/ч		
	Продукт	Ацетат	Этанол
Изопропанол	6,361290323	0	2,041474
Изопрен	1,83911141	2,254854	4,152353

Целевой продукт	CO2/H2 + аргинин 48 ммоль CO2/H2 + 2 ммоль аргинина /г DW/ч		
	Продукт	Ацетат	Этанол
Изопропанол	5,359773808	0	1,559777
Изопрен	1,586671154	1,813014	3,365227

Моделирование продемонстрировало, что добавление аргинина может значительно увеличить максимальные теоретические объемы продуцирования целевых соединений изопропанола и изопрена как на CO, так и на CO_2/H_2. Максимальное продуцирование изопропанола из CO можно значительно увеличить более чем на 20% с 5,06 ммоль/г DW/ч до 6,42 ммоль/г DW/ч даже с небольшим количеством поглощения аргинина (2 мМ, 0,34 г/л). Для АТФ, использующего мевалонатный путь для продуцирования изопрена из CO, максимальное продуцирование может быть увеличено еще более значительно - более чем на 30%: с 1,97 до 2,58 ммоль/г DW/ч. Указанный эффект является еще более выраженным при продуцировании из CO_2/H_2, когда максимальное продуцирование изопропанола может быть увеличено более чем на 25%: с 5,0 до 6,36 ммоль/г DW/ч, а продуцирование изопрена - на 45%: с 1,26 до 1,83 ммоль/г DW/ч. Это наглядно демонстрирует, что аргинин можно использовать для увеличения продуцирования не встречающихся в природе целевых молекул.

Моделирование также показывает, что при совместном использовании 2 мМ аргинина продуцирование даже увеличивается с меньшим поглощением CO, демонстрируя, что добавление аргинина повышает эффективность углерода для получения целевой молекулы.

Пример 6. Использование репрессора аргинина в качестве генетического переключателя для стимуляции экспрессии гетерологичных путей.

Этот пример демонстрирует, что аргинин можно использовать в качестве генетического переключателя для стимуляции экспрессии гетерологичных путей.

Обнаружено, что все гены в идентифицированном пути аргининдезиминазы по примеру 3 сгруппированы вместе, а также обнаружен репрессор аргинина ArgR. Операторные последовательности (последовательности ДНК, с которыми связывается белок argR, чтобы предотвратить транскрипцию гена) были идентифицированы в ряде микроорганизмов, включая E.coli (Tian et al., 1992, J. Mol. Biol., 226, p. 387-397), при этом сайт связывания, как правило, сохраняется на бактериальных линиях (Makarova et al., 2001, Genome Biol., 2, p. 1-8).

Репрессор аргинина контролирует экспрессию гена путем связывания с палиндромной операторной последовательностью, которая расположена примерно на 45 п.о. выше стартового кодона аргининдезиминазы. Добавление аргинина приводит к тому, что репрессор отвязывает операторную последовательность, что обеспечивает транскрипцию генов в направлении 3'-операторной последовательности. В примере возможного применения гетерологичная экспрессия гена может быть активирована путем добавлением аргинина. Гетерологичная экспрессия гена будет подавляться белком argR, если операторная последовательность, связывающая argR, добавляется в "левый" участок оперона гетерологичных генов. Таким образом, экспрессию гена можно активировать добавлением аргинина.

В одном примере гетерологичные гены могут кодировать метаболический путь, для которого необходим АТФ для синтеза продукта. Например, мевалонатный путь представляет собой гетерологичный путь, который превращает ацетил-КоА в изопентенилдифосфат при стоимости 3 молей АТФ, равной стоимости моля изопентенилдифосфата. С помощью описанного способа экспрессию гетерологичного мевалонатного пути можно активировать добавлением аргинина, который также будет обеспечивать АТФ для мевалонатного пути путем расщепления аргинина посредством пути аргининдезиминазы.

Пример 7. Оптимизация эффективности совместного использования аргинина с газообразными субстратами CO, и/или H_2, и/или CO_2.

Для достижения эффективного совместного использования аргинина с газообразными субстратами CO, и/или H_2, и/или CO_2 может потребоваться устранение регуляции. Это может быть достигнуто путем

нокаута описанного выше репрессора аргинина ArgR для устранения репрессии генов пути аргининдезиминазы. Такие нокауты могут быть осуществлены любым специалистом в данной области техники с помощью способов, описанных ранее (WO 2012053905, WO 2012115527, WO 2013180584). Однако удаление репрессора аргинина не даст возможности активировать экспрессию гетерологичного гена путем добавления аргинина, как описано выше. Альтернативным методом было бы удаление вышеописанных оператор-связывающих последовательностей в "левом" участке оперона пути аргининдезиминазы или замена "левого" участка оперона пути аргининдезиминазы, включая операторную последовательность и промоторную последовательность, на конститутивный или синтетический промотор. Такие модификации могут быть осуществлены любым специалистом в данной области техники с помощью способов, описанных ранее (WO 2012053905, WO 2012115527, WO 2013180584). Подходящими конститутивными и синтетическими промоторами являются, но не ограничиваются ими, промотор ферредоксина Pfdx, промотор ацетаткиназы Ppta, или Ptet, или PIPL12, которые были описаны ранее (US 20160160223; Nagaraju et al., Редактирование генома Clostridium autoethanogenum с применением CRISPR/Cas9, Biotechnol. Biofuels., 2016, 9:219).

Аналогично промоторные области генов, ответственных за использование CO, и/или H_2, и/или CO_2, такие как кластер Вуд-Льюнгдала или оперон Hyt (Brown et al., Сравнение одномолекулярного секвенирования и гибридных подходов для конечной обработки генома Clostridium autethanogenum и анализ систем CRISPR в промышленно значимых, Clostridia. Biotechnology for Biofuels, 2014, 7:40), могут быть заменены конститутивными и синтетическими промоторами или соответствующими регуляторами с помощью нокаута или нокдауна. Специалисты в данной области техники смогут идентифицировать такие регуляторы из данных транскриптомики, как описано в примере 10.

Пример 8. Альтернативный путь использования аргинина и продуцирование путресцина.

Этот пример демонстрирует альтернативный путь использования аргинина, в результате которого может продуцироваться путресцин как побочный продукт.

Другим возможным путем использования аргинина является декарбоксилирование аргинина вместо дезаминирования: аргинин может быть декарбоксилирован в агматин и CO_2 с помощью фермента аргининдекарбоксилазы. Агматин может быть затем превращен в N-карбамоил-путресцин с помощью фермента агматиндезиминазы, с получением также аммония. N-карбамоил-путресцин плюс фосфат может быть превращен в путресцин плюс карбамоилфосфат с помощью фермента путресцинкарбамоилтрансферазы. Карбамоилфосфат плюс АДФ превращается в аммоний+АТФ+CO_2 с помощью карбаматкиназы по тому же механизму, что и в пути аргининдезиминазы. Чистый выход аммония и АТФ является таким, что и в пути аргининдезиминазы, но с двумя другими промежуточными продуктами (агматин и N-карбамоил-путресцин вместо цитруллина) и другим побочным продуктом (путресцин вместо орнитина).

Путресцин является побочным продуктом большей ценности, чем орнитин или аргинин, и может быть использован в качестве исходного сырья при продуцировании различных полимеров, включая нейлон-4,6 (Qian et al., 2009, Biotechnol. Bioeng., 104, p. 651-662) и полиуретан (Dahiyat et al., 1993, J. Biomater. Sci. Polym., ed, 4, p. 529-543).

Таблица 9

Названия генов	Номер EC	Идентификаторы
Аргининдекарбоксилаза	EC 4.1.1.9	AGY76455, CAETHG_2244
Агматиндезиминаза	EC 3.5.3.12	AGY76293.1, CAETHG_2074
Путресцинкарбамоилтрансфераза	EC 2.3.1.6	EKU86922, WP_003731415.1, AGY76301
Карбаматкиназа	EC 2.7.2.2	AGY77835, CAETHG_3632

Пример 9. Продуцирование аланина и превращение в 3-HP или акриловую кислоту посредством гетерологичных путей.

Этот пример демонстрирует превращение аланина в 3-гидроксипропионат или акриловую кислоту.

Продуцирование аланина из аргинина микроорганизмом C. autoethanogenum было продемонстрировано в примере 1. Алании может быть в дальнейшем превращен в высокоценные продукты 3-гидроксипропионата (3-HP) или акриловую кислоту.

Превращение аланина в акрилат было показано в Clostridium propionicum (R.K. Dalai, M. Akedo, C.L. Cooney, A.J. Sinskey (1980), Микробный путь продуцирования акриловой кислоты, Biosources Dig 2:89-97). Конверсия может происходить через малонил-семиальдегид и 3-HP или через аланил-КоА. Как 3-HP, так и аланил-КоА могут быть превращены в акрилил-КоА и далее в акрилат. Выделенные гены/ферменты C. propionicum могут быть введены и гетерологично экспрессированы любым специалистом в данной области с помощью способов, описанных ранее, с целью продуцирования 3-гидроксипропионата или ацилата (WO 2012053905, WO 2012115527, WO 2013180584).

Пример 10. Транскриптометрический анализ.

Транскриптометрический анализ биореакторных культур биологического дубликата C. autoethanogenum, растущих гетеротрофно на среде 4АК; см. табл. 2) осуществляли с помощью секвенирования РНК. Во время сбалансированной фазы роста и поглощения всех 4АК приблизительно 35 мл культуры 0,3 г DCW/л собирали, гранулировали (5000×г в течение 3 мин при 4°C) и ресуспендировали в 5 мл RNAlater (Qiagen). Образец хранили при 4°C в течение ночи, центрифугировали (4000×г в течение 10 мин при 4°C) и осадок хранили при -80°C до дальнейшей обработки. Замороженные гранулы оттаивали, экстрагировали общую РНК, а библиотеки мРНК подготавливали, как описано в Marcellin et al., 2013, Секвенирование выполняли с помощью секвенсера, Illumina Hiseq-2000.

Профили экспрессии генов на среде 4АК сравнивали с опубликованными ранее данными РНК-секв. того же штамма C. autoethanogenum (DSM 10061), выращенного гетеротрофно на стандартной среде PETC-MES (включая YE) (Marcellin et al., 2016). Последовательные считывания данных обоих гетеротрофных условий усекали во избежание ошибок считывания, а затем выравнивали/сведили к геному с использованием TopHat2 с (Kim et al., 2013) двумя несоответствиями, разрешенными для выравнивания считывания. Численность транскриптов оценивали с помощью функции FPKM от Cufflinks, применяя нормировку верхних квартилей. CuffDiff применяли для оценки дифференциально выраженных транскриптов, а Cuffhorm применяли для нормализации данных, q-значение ниже 0,05 (с применением уровня ложноположительных результатов; Benjamini и Hochberg, 1995) применяли для определения достоверных изменений экспрессии генов.

Транскриптометрический анализ с применением РНК-секвенирования (РНК-секв.) проводили для дальнейшего получения подтверждающих данных вовлечения пути ADI на уровне экспрессии генов. С этой целью отбирали биореакторные культуры биологического дубликата C. Autoethanogenum, растущие гетеротрофно на среде 4АК, во время фазы сбалансированного роста. Этот набор данных РНК-секв. сравнивали с ранее опубликованным набором данных (Marcellin et al., 2016) того же штамма C. autoethanogenum (DSM 10061), выращенного гетеротрофно (фруктоза) на стандартной YE-содержащей среде PETC-MES.

Транскриптометрический анализ доказал роль пути ADI, поскольку все гены пути ADI характеризовались более чем 500-кратной повышенной регуляцией (q-значения <0,001), в случаях когда клетки выращивались на среде PETC-MES, дополненно 4АК по сравнению с YE. Кроме того, наблюдали более чем 380-кратное повышение регуляции (q-значения <0,001) предполагаемых антипортерных генов аргинина-орнитина (CAETHG_3023 и _3024). Данные, полученные авторами из четырех генов, ассоциированных с расщеплением цитруллина в карбамоилфосфат и орнитин в C. autoethanogenum, демонстрируют, что орнитинкарбамоилтрансфераза (CAETHG_3022) является белком, катализирующим поток (645-кратное повышение регуляции, q<0,001) при катаболизме ARG в C. autoethanogenum, поскольку его изоферменты характеризовались либо пониженной регуляцией (CAETHG_0449 и _0591), либо не продемонстрировали изменений (CAETHG_2082) между сравниваемыми условиями. Аналогичным образом из пяти генов, ассоциированных с расщеплением карбамоилфосфата в CO_2, карбаматкиназа CAETHG_3025, повидимому, представляет собой белок, катализирующий поток (623-кратное повышение регуляции, q<0,001), поскольку ее значение FPKM в 1000 раз выше, чем значения FPKM для ее изоферментов.

Пример 11. Оптимизация эффективности включения аргинина в центральный метаболизм.

Транскриптометрический анализ выявил гены, которые в нативном метаболизме определяют поток использования аргинина и включения в центральный метаболизм в виде орнитинкарбамоилтрансферазы (CAETHG_3022) и карбаматкиназы (CAETHG_3025). Для повышения эффективности эти гены можно сверхэкспрессировать с помощью сильных или индуцибельных промоторов, например, но не ограничиваясь ими, промотор ферредоксина Pfdx, промотор ацетаткиназы Ppta, или Ptet, или PIPL12, которые были описаны ранее (US 20160160223; Nagaraju et al., Редактирование генома Clostridium autoethanogenum с применением CRISPR/Cas9, Biotechnol Biofuels., 2016, 9:219).

Все ссылки, включая публикации, заявки на патенты и патенты, приведенные в данном описании, включены в данный документ посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая ссылка была индивидуально и конкретно указана для включения посредством ссылки и была изложена в данном описании во всей своей полноте. Ссылка на любой предшествующий уровень техники в этом описании не является и не должна рассматриваться как подтверждение того, что предшествующий уровень техники является частью известных общедоступных знаний в области науки в любой стране.

В контексте описания данного изобретения (особенно в контексте последующей формулы изобретения) термины в единственном числе относятся как к единственному, так и множественному числу, если не указано иное или явно противоречит контексту. Термины "состоящий", "имеющий", "включающий" и "содержащий" следует толковать как неограничивающие (т.е. означающие "включающий, но не ограничиваясь этим"), если не указано иное. Приведение диапазонов значений в данном описании предназначено исключительно с целью упростить ссылку по отдельности на каждое значение внутри диапазона, если не указано иное, и каждое отдельное значение включено в данное описание, как если бы оно было представлено отдельно.

Все описанные в данном документе способы могут быть осуществлены в любом подходящем порядке, если не указано иное или это явно не противоречит контексту. Любые примеры или приведение в качестве примера (например, "такой как") в данном документе предназначены исключительно для лучшего объяснения изобретения и не накладывают ограничений на объем данного изобретения, если в формуле изобретения не заявлено иное. Никакую формулировку в данном описании не следует понимать в качестве указывающей на какой-либо отсутствующий в формуле изобретения элемент, как на элемент, существенный для практического применения изобретения.

В данном документе описаны предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения. Вариации этих предпочтительных вариантов осуществления изобретения могут стать очевидными для специалистов в данной области техники после прочтения вышеприведенного описания. Авторы предполагают, что квалифицированные специалисты при необходимости будут применять варианты реализации данного изобретения, отличающиеся от конкретных вариантов, описанных в данном документе. Соответственно это изобретение включает все модификации и эквиваленты предмета, указанного в формуле изобретения, прилагаемой к настоящему документу, в соответствии с применяемым законодательством. Более того, любая комбинация описанных выше элементов во всех возможных вариантах входит в объем данного изобретения, если в данном документе не указано иное или это явно не противоречит контексту.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ повышения эффективности ферментации газообразного C1-содержащего субстрата при получении продукта,

при этом указанный способ включает

a) впускание потока газообразного C1-содержащего субстрата в биореактор, содержащий культуру C1-фиксирующего микроорганизма в жидкой питательной среде; и

b) ферментацию культуры с целью получения по меньшей мере одного продукта,

при этом аргинин добавляют в культуру в качестве единственного источника азота, и

при этом C1-фиксирующий микроорганизм представляет собой рекомбинантный генетически модифицированный микроорганизм, содержащий путь метаболизма аргинина, и где C1-фиксирующий микроорганизм представляет собой Clostridium.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанный путь метаболизма аргинина включает в себя путь аргининдезиминазы и/или путь аргининдекарбоксилазы, при этом путь аргининдезиминазы включает в себя один или большее количество ферментов, выбранных из группы, состоящей из аргининдезиминазы (EC 3.5.3.6), орнитинкарбамоилтрансферазы (EC 2.1.3.3) и карбаматкиназы (EC 2.7.2.2), а путь аргининдекарбоксилазы включает в себя один или большее количество ферментов, выбранных из группы, состоящей из аргининдекарбоксилазы (EC 4.1.1.19), агматиндезиминазы (EC 3.5.3.12), путресинкарбамоилтрансферазы (EC 2.1.3.6) и карбаматкиназы (EC 2.7.2.2).

3. Способ по п.2, где указанный путь метаболизма аргинина включает в себя одно или более из сверхэкспрессированного эндогенного фермента, мутированного эндогенного фермента или экзогенного фермента.

4. Способ по п.1, отличающийся тем, что аргинин добавляют в культуру в количестве, превышающем потребности клеток культуры вплоть до 1000 раз.

5. Способ по п.1, отличающийся тем, что концентрация аргинина в биореакторе составляет по меньшей мере 20 мг/л.

6. Способ по п.1, отличающийся тем, что потребность клеток культуры составляет 0,012 г аргинина на грамм клеточной биомассы.

7. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанный продукт выбирают из группы, состоящей из этанола, 2,3-бутандиола, 1,3-бутандиола, лактата, сукцината, метилэтилкетона (MEK), бутирата, 2-бутанола, 1,2-пропандиола (1,2-PDO), 1-пропанола, изопропанола (IPA), ацетоина, изобутанола, изопрена, фарнезена, бисаболена, пинена, лимонена, ацетона, 3-гидроксибутирата, 2-гидроксиизомасляной кислоты (2-HIBA), цитрамалата, бутадиена, полимолочной кислоты, 1-бутанола, 3-гидроксипропионата (3-HP), бензоата, этиловых эфиров жирной кислоты, жирных кислот и изобутилена.

8. Способ по п.1, где аргинин катаболизируется посредством пути метаболизма аргинина для продуцирования аммония, при этом C1-фиксирующий микроорганизм использует аммоний в качестве источника азота.

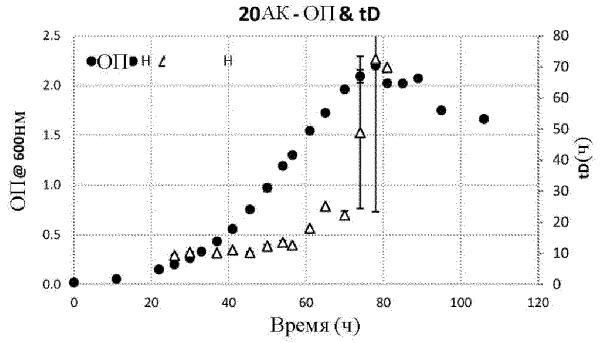
9. Способ по п.1, отличающаяся тем, что указанный C1-фиксирующий микроорганизм содержит разрушающую мутацию в транспортере аргинина:орнитина.

10. Способ по п.1, где C1-фиксирующий микроорганизм содержит одну или большее количество генетических модификаций в пути метаболизма аргинина, причем одна или большее количество генетических модификаций выбраны из группы, состоящей из (i) разрушающей мутации регуляторных элементов и (ii) замены сайтов связывания оператора или нативных промоторов на конститутивные или синтетические промоторы.

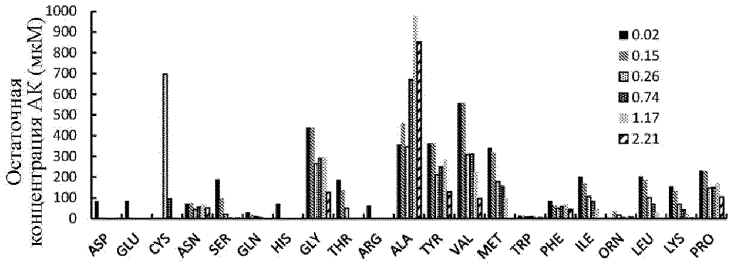
11. Способ по п.10, отличающийся тем, что указанная разрушающая мутация представляет собой

нокаут репрессора аргинина argR.

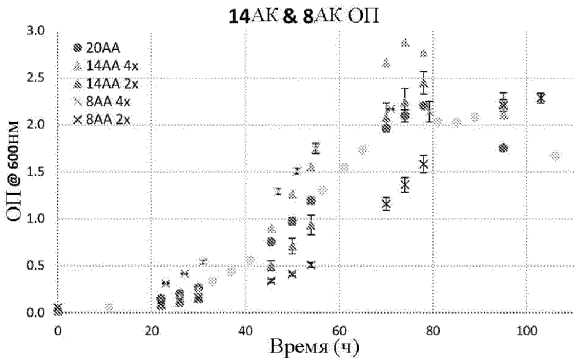
12. Способ по п.10, отличающийся тем, что указанная замена представляет собой замену промотора оперона пути аргининдезиминазы на конститутивный или синтетический промотор.



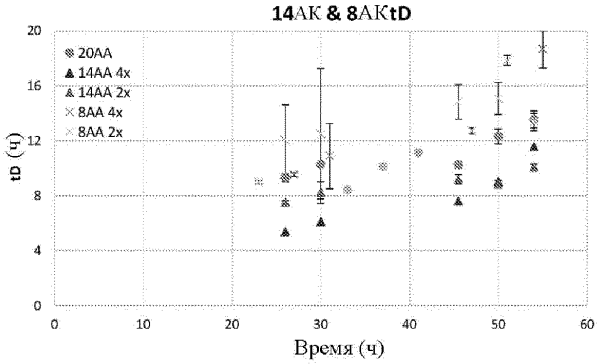
Фиг. 1



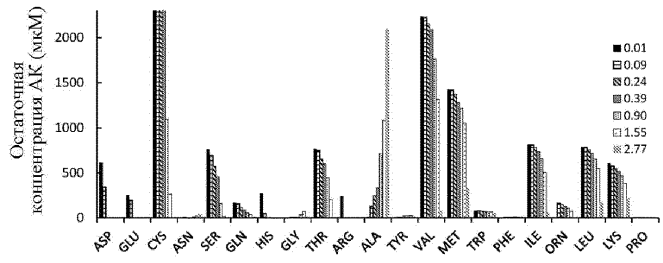
Фиг. 2



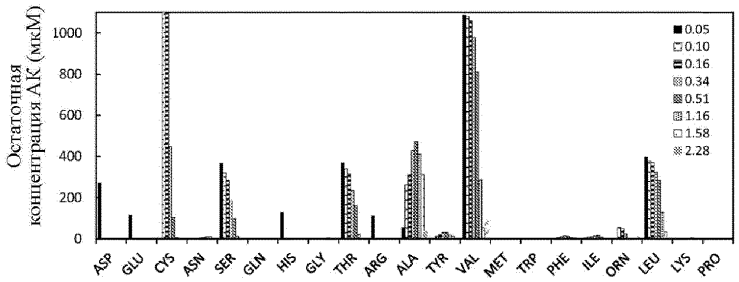
Фиг. 3



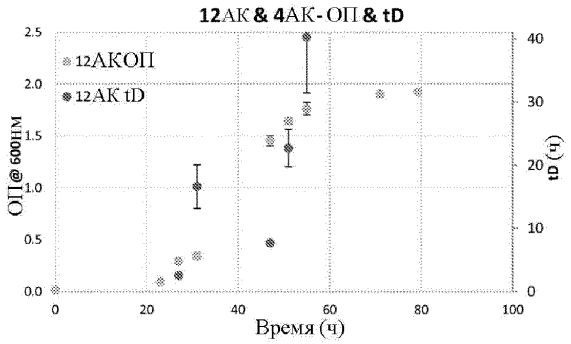
Фиг. 4



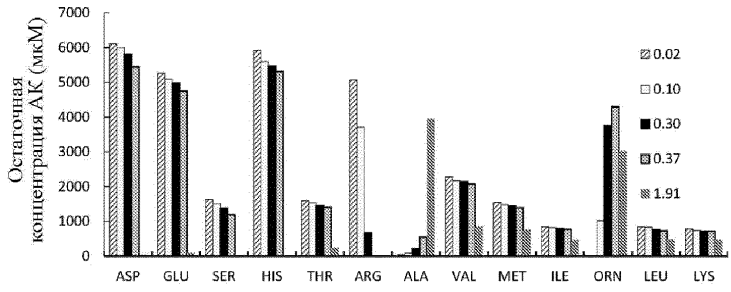
Фиг. 5



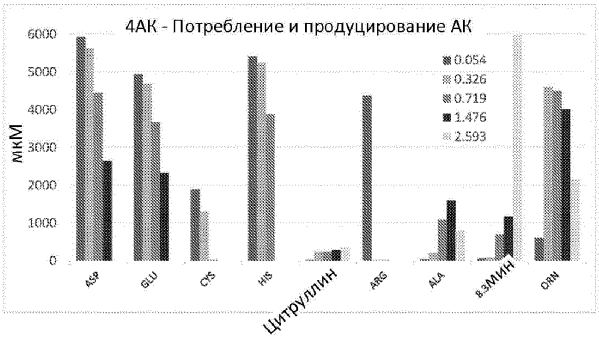
Фиг. 6



Фиг. 7

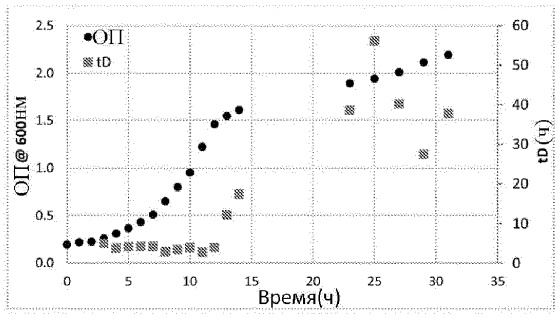


Фиг. 8

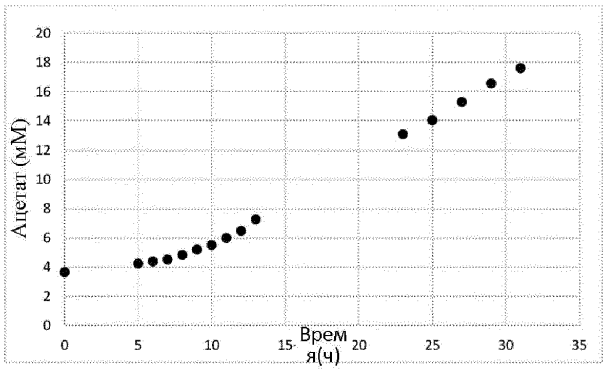


Фиг. 9

Фиг. 10



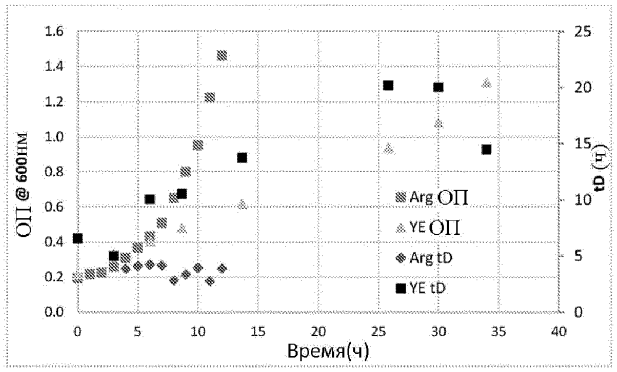
Фиг. 11



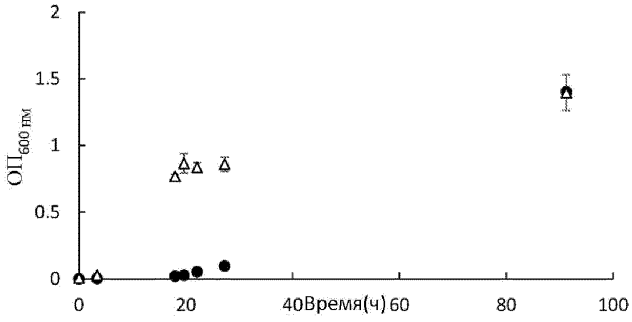
Фиг. 12

Фиг. 13

Фиг. 14

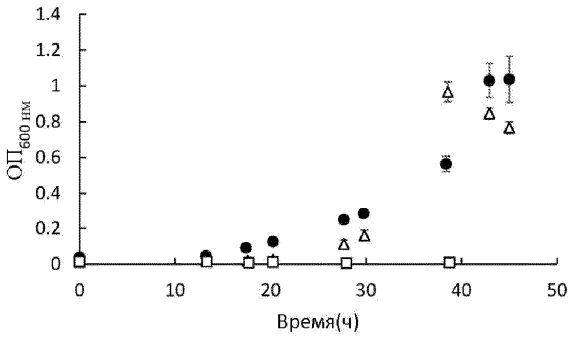


Фиг. 15



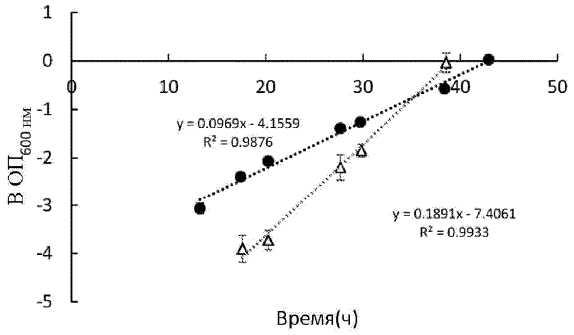
С добавлением (△) и без добавления (●) аргинина (n = 3, среднее ± СО)

Фиг. 16



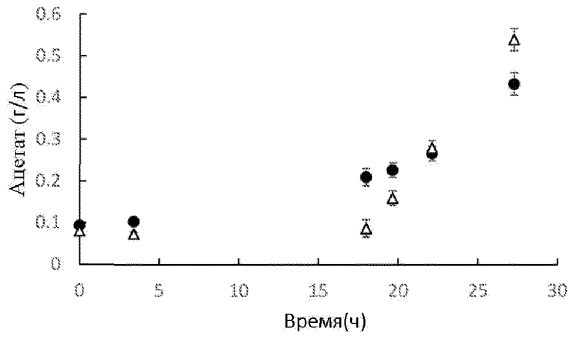
С добавлением (△) аргинина, без добавления (●) аргинина; только аргинин (□) (n = 3, среднее ± СО)

Фиг. 17

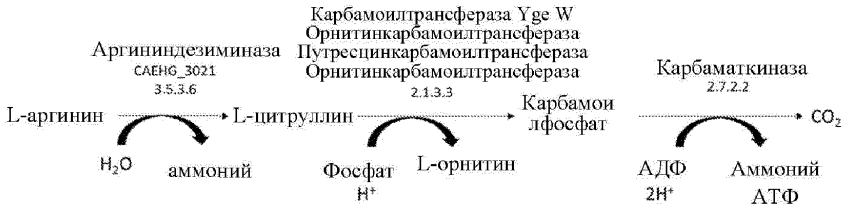


C. autoethanogenum DSM 23693 с добавлением (△) и без добавления (●) аргинина

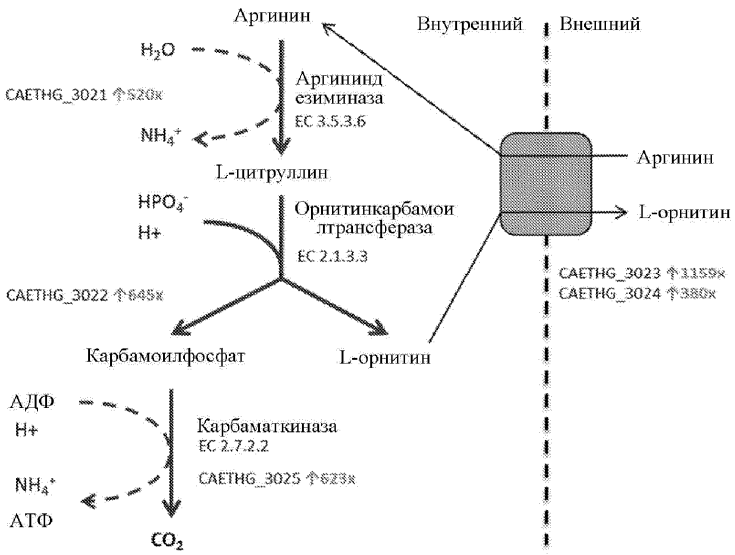
Фиг. 18



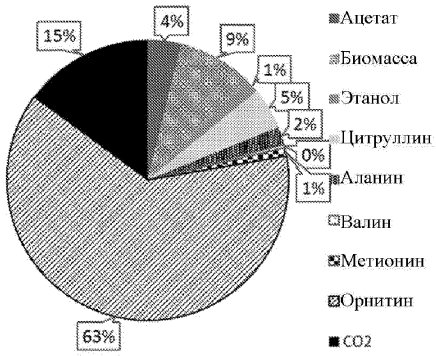
Фиг. 19



Фиг. 20

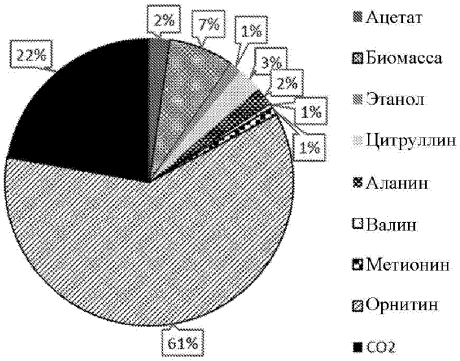


Фиг. 21



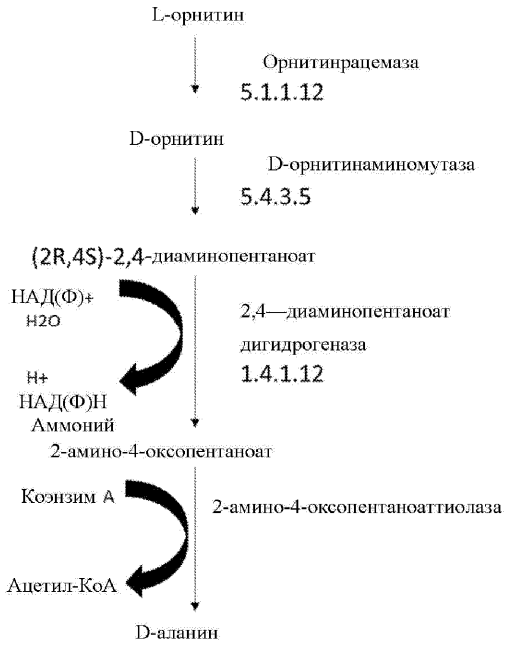
4АК

Фиг. 22А

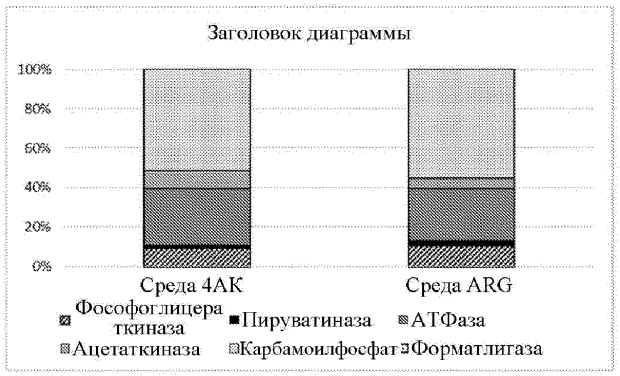


ARG

Фиг. 22B



Фиг. 23



Фиг. 24