

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **041749**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.11.29

(21) Номер заявки
201892627

(22) Дата подачи заявки
2017.05.12

(51) Int. Cl. **C12N 1/20** (2006.01)
C12P 7/06 (2006.01)
C12N 9/04 (2006.01)
C12N 9/02 (2006.01)

(54) **МИКРООРГАНИЗМ С МОДИФИЦИРОВАННОЙ АКТИВНОСТЬЮ
АЛЬДЕГИД:ФЕРРЕДОКСИН ОКСИДОРЕДУКТАЗЫ И СВЯЗАННЫЕ СПОСОБЫ**

(31) **62/336,639**

(32) **2016.05.14**

(33) **US**

(43) **2019.04.30**

(86) **PCT/US2017/032564**

(87) **WO 2017/200884 2017.11.23**

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

(72) Изобретатель:
Лью Фунминь, Кёпке Михель (US)

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

(56) BASEN, MIRKO et al.: "Single gene insertion drives bioalcohol production by a thermophilic archaeon", P. N. A. S., [E-pub] 03 November 2014, vol. 111, № 49, p. 17618-17623, see p. 17618, "significance" section; p. 17619, right column, paragraph 3; p. 17620, left column, paragraph 1; p. 17622, left column, paragraph 4

US-A1-20150079650

US-A1-20100151543

HEIDER, JOHANN et al.: "Purification, characterization, and metabolic function of tungsten-containing aldehyde ferredoxin oxidoreductase from the hyperthermophilic and proteolytic archaeon Thermococcus strain ES-1", Journal of Bacteriology, August 1995, vol. 177, № 16, p. 4757-4764, see the whole document

LIEW, FUNGMIN et al.: "Metabolic engineering of Clostridium autoethanogenum for selective alcohol production", Metabolic Engineering, [E-pub] 19 January 2017, vol. 40, p. 104-114, see p. 107, "2.6.3" section, abstract

(57) Данное изобретение предлагает не встречающуюся в природе бактерию, имеющую уменьшенную или устраненную активность фермента, который катализирует реакцию, определяемую EC 1.2.7.5, такого как альдегид:ferredоксин оксидоредуктаза (AOR). Необязательно указанная бактерия также имеет уменьшенную или устраненную активность фермента, который катализирует реакцию, определяемую EC 1.2.1.10 и/или EC 1.1.1.1, такого как альдегиддегидрогеназа, алкогольдегидрогеназа или бифункциональная альдегид/алкогольдегидрогеназа. Кроме того, данное изобретение предлагает способы производства продуктов путем культивирования указанной бактерии в присутствии газообразного субстрата, содержащего один или большее количество из CO, CO₂ и H₂.

B1**041749****041749 B1**

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Данная заявка заявляет приоритет предварительной заявки на патент США 62/336639, поданной 14 мая 2016 г., которая во всей полноте включена в данную заявку посредством ссылки.

Уровень техники

Пагубное воздействие на окружающую среду, вызванное продолжающейся добычей и эксплуатацией ископаемых видов топлива для получения энергии и химических веществ в сочетании с присущей им истощаемой природой, является основным фактором, способствующим разработке устойчивых альтернатив. В связи с этим ферментация газа стала перспективной технологией для биологической конверсии промышленных отходов в топливо и химикаты. Однако на сегодняшний день только ограниченный набор продуктов было получено с помощью ферментации газа в основном из-за отсутствия генетических инструментов и ферментативных путей, которые в настоящее время разработаны для газоперерабатывающих бактерий. Соответственно остается потребность в альтернативных микроорганизмах и способах производства топлива и химических веществ.

Сущность изобретения

Данное изобретение предлагает не встречающуюся в природе бактерию, имеющую уменьшенную или устраненную активность фермента, который катализирует реакцию, определяемую ЕС 1.2.7.5, по сравнению с исходной бактерией. Как правило, не встречающаяся в природе бактерия содержит по меньшей мере одну разрушающую мутацию в гене, кодирующем фермент, который катализирует реакцию, определяемую ЕС 1.2.7.5. В предпочтительном варианте осуществления данного изобретения фермент, который катализирует реакцию, определяемую ЕС 1.2.7.5, представляет собой альдегид:ферредоксин оксидоредуктазу (AOR).

Иногда не встречающаяся в природе бактерия дополнительно имеет сниженную или устраненную активность по меньшей мере одного фермента, который катализирует реакцию, определяемую ЕС 1.2.1.10 и/или ЕС 1.1.1.1, по сравнению с исходной бактерией благодаря по меньшей мере одной разрушающей мутации в гене, кодирующем фермент, который катализирует реакцию, определяемую ЕС 1.2.1.10 и/или ЕС 1.1.1.1. Фермент, который катализирует реакцию, определяемую ЕС 1.2.1.10 и/или ЕС 1.1.1.1, предпочтительно выбирают из группы, состоящей из бифункциональной альдегид/алкогольдегидрогеназы, альдегиддегидрогеназы и алкогольдегидрогеназы.

Эти генетические модификации делают не встречающуюся в природе бактерию пригодной для получения таких продуктов, как ацетил-СоА, ацетоацетил-СоА, ацетоацетат, ацетон, изопропанол, 3-гидроксиизовалерил-СоА, 3-гидроксиизовалерат, изобутилен, изопрен, 3-гидроксибутирил-СоА, 3-гидроксибутират, 3-гидроксибутириловый альдегид, 1,3-бутандиол, 2-гидроксиизобутирил-СоА, 2-гидроксиизобутират, пируват, ацетолактат, ацетоин, 2,3-бутандиол и лактат.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения бактерия, не встречающаяся в природе, представляет собой С1-фиксирующую бактерию, такую как бактерия, которая потребляет газообразный субстрат, содержащий один или большее количество из СО, СО₂ и Н₂.

Не встречающаяся в природе бактерия, как правило, получена из исходной бактерии, которая содержит фермент, который катализирует реакцию, определяемую ЕС 1.2.7.5, такой как *Alkalibaculum bacchi*, *Blautia product*, *Butyrivibrio methylotrophicum*, *Chloroflexus aurantiacus*, *Clostridium acetivibrio*, *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium carboxidivorans*, *Clostridium coskatii*, *Clostridium drakei*, *Clostridium formicoaceticum*, *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium ragsdalei*, *Desulfovibrio vulgaris*, *Eubacterium limosum*, *Geobacter sulfurreducens*, *Methylomicrobium alcaliphilum*, *Moorella thermoautotrophica*, *Moorella thermoacetica*, *Rhodospirillum rubrum*, *Sporomusa ovata*, *Sporomusa silvacetica*, *Sporomusa sphaeroides*, *Thermanaerovibrio acidaminovorans*, *Thermanaerovibrio acidaminovorans*, *Thermoanaerobacter wiegelsii*, *Thermodesulfovibrio yellowstonii*, *Thermodesulfovibrio yellowstonii*, или *Thermus thermophilus*.

Кроме того, данное изобретение относится к способу производства продукта путем культивирования такой не встречающейся в природе бактерии. Это культивирование может быть осуществлено в присутствии газообразного субстрата, содержащего один или большее количество из СО, СО₂ и Н₂.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 изображена ацетогенная схема пути биосинтеза этанола в *C. autoethanogenum*. В левом нижнем углу изображены АТФ-эффективный не прямой путь синтеза этанола с привлечением фосфотрансацетилазы (Pta), ацетат-киназы (Ack) и альдегид:ферредоксин оксидоредуктазы (AOR). В середине изображен прямой путь биосинтеза этанола с привлечением бифункциональной альдегид/алкогольдегидрогеназы (AdhE) или СоА-зависимой ацетальдегиддегидрогеназы (Ald) и алкогольдегидрогеназы (Adh).

AlsS = ацетолактатсинтаза;

2,3-BDH = 2,3-бутандиолдегидрогеназа;

BudA = ацетолактатдекарбоксилаза;

CODH = дегидрогеназа окиси углерода;

CoFeSP = кориноидный железо-серосодержащий белок;

Fd_{ок} = окисленный ферредоксин;

$Fd_{вос}$ = восстановленный ферредоксин;

HytABCDE = NADP-зависимая, бифурцирующая электроны, гидрогеназа;

Nfn = трансгидрогеназа;

Pfor = пируват:ферредоксин оксидоредуктаза;

Rnf = H^+ -транслоцирующая ферредоксин:NAD⁺-оксидоредуктаза.

Фиг. 2 представляет собой набор изображений гелей, демонстрирующих скрининг и валидацию штаммов aor1 и aor2 КО.

(А) Гель-электрофорез ПЦР с использованием экзон-охватывающих праймеров.

Дорожки 3 и 4 = aor1 КО штаммы;

дорожки 7-16 = aor2 КО штаммы;

дорожки 1 и 6 = контроли без образца;

дорожки 5 и 17 = контроли ДТ;

M = NEB 2-log ДНК-маркер в т.п.о.

(В) Саузерн-блот-анализ разрезанной HindIII геномной ДНК штаммов aor1 КО (дорожки 18-20) и штаммов aor2 КО (дорожки 21-23).

L = Promega лямбда ДНК/HindIII маркер в п.о.

Фиг. 3 представляет собой набор изображений гелей, демонстрирующих скрининг и валидацию штаммов adhE1a, adhE1b и adhE2 КО.

(А) Гель-электрофорез ПЦР с использованием экзон-охватывающих праймеров.

Дорожки 2-4 = adhE1a КО штаммы;

дорожки 7-9 = adhE1b КО штаммы;

дорожки 12-14 = adhE2 КО штаммы;

дорожки 1, 6 и 11 = контроли без образца;

дорожки 5, 10 и 15 = контроли ДТ;

M = NEB 2-log-ДНК-маркер.

(В) Саузерн-блот-анализ разрезанной HindIII геномной ДНК штаммов adhE1a КО (дорожки 16-18), штаммов adhE1b КО (дорожки 19 и 20) и штаммов adhE2 КО (дорожки 21-23).

L = Promega лямбда ДНК/HindIII.

Фиг. 4 представляет собой набор изображений гелей, демонстрирующий валидацию штамма двойного КО с восстановленным ругЕ.

(А) ПЦР-скрининг штамма Δ aor2 и aor1 КО.

(В) ПЦР-скрининг аутоτροφного по урауилу штамма aor с двойным КО на предмет наличия восстановленного аллеля ругЕ.

(С) Саузерн-блот-анализ штамма aor1 КО.

M = NEB 2-log-ДНК-маркер;

1-6 = пара праймеров aor2-seq-F и aor2-seq-R;

7-12 = пара праймеров aor1-559s-F и aor1-559s-R;

13-18 = пара праймеров ACE-ругЕ-F и ACE-ругЕ-R;

1, 7 и 13 = контроли без образца;

6, 12, 18 и 23 = контроль с геномной ДНК *C. autoethanogenum* ДТ;

2-5, 8-11, 14-17 = клоны штамма aor с двойным КО с восстановленным ругЕ;

19-22 = разрезанная HindIII геномная ДНК штамма aor1 КО.

Фиг. 5 представляет собой набор изображений гелей, демонстрирующий скрининг штаммов *C. autoethanogenum* Δ adhE1mut, Δ adhE1 и Δ adhE1+2.

(А) ПЦР-скрининг штаммов Δ adhE1mut.

(В) ПЦР-скрининг штаммов Δ adhE1.

(С) ПЦР-скрининг штаммов Δ adhE1+2.

Дорожки 5, 8, 9, 10, 15 и 16 = Δ adhE1mut штаммы;

дорожки 28, 29, 32, 33 и 38 = Δ adhE1 штаммы;

полосы 47-55 = Δ adhE1+2 штаммы;

дорожки 1, 19 и 45 = контроли без образца;

дорожки 18, 44 и 56 = контроль с геномной ДНК ДТ;

M = NEB 2-log ДНК-маркер в т.п.о.

Фиг. 6 представляет собой набор графиков, показывающих рост, изменение давления в незаполненном объеме и профили метаболитов *C. autoethanogenum* ДТ (круги), aor1 КО (треугольники), aor2 КО (квадраты) и aor1+2 КО штаммы (ромбы) на CO.

(А) Профиль роста.

(В) Изменение давления в незаполненном объеме от начала до конца культивирования.

(С) Профиль ацетата.

(D) Профиль этанола.

(E) Профиль 2,3-бутандиола.

(F) Профиль лактата.

Для каждого штамма $n=4$ за исключением aor2 КО, для которого $n=3$;
отрезки отклонений = СОС.

Фиг. 7 представляет собой набор изображений гелей, демонстрирующих верификацию комплементированного штамма aor1.

(A) ПЦР геномной ДНК из штамма aor1, комплементированного aor1 (дорожки 2-4), с использованием, охватывающих экзон, праймеров aor1.

M = NEB 2-Log ДНК-маркер;

1 = контроль без образца;

5 = контроль геномной ДНК ДТ;

6 = контроль aor1 КО;

(B) рестрикция AscI и PmeI полученных плазмид pMTL83151-PacA-aor1 из комплементированного штамма (дорожки 7-12).

Фиг. 8 представляет собой набор графиков, показывающих рост, давление в незаполненном объеме и метаболические профили *C. autoethanogenum* ДТ, aor1 КО и комплементированные aor1 штаммы на СО с 200 кПа.

(A) Профиль роста.

(B) Изменение давления в незаполненном объеме.

(C) Профиль ацетата.

(D) Профиль этанола.

(E) Профиль 2,3-бутандиола.

(F) Профиль лактата.

Круги = ДТ ($n=4$);

треугольники = aor1 штаммы ($n=4$);

квадраты = комплементированные штаммы aor1 ($n=3$);

отрезки отклонений = стандартная ошибка среднего.

Фиг. 9 представляет собой набор графиков, показывающих профили роста и метаболитов штаммов *C. autoethanogenum* ДТ, aor1 КО, aor2 КО и aor1+2 КО на фруктозе.

(A) Профиль роста.

(B) Профиль ацетата.

(C) Профиль этанола.

(D) Профиль 2,3-бутандиола.

Круги = ДТ ($n=4$);

треугольники = aor1 штамм ($n=3$);

квадраты = aor2 ($n=3$);

ромбы = aor1+2 КО штамм ($n=4$);

отрезки отклонений = СОС.

Фиг. 10 представляет собой набор графиков, показывающих рост, давление в незаполненном объеме и профили метаболитов *C. autoethanogenum* ЦТ и aor1+2 КО на H_2+CO_2 .

(A) Профиль роста.

(B) Изменение давления в незаполненном объеме.

(C) Профиль ацетата.

(D) Профиль этанола.

Круги = ДТ ($n=4$);

квадраты = aor1+2 КО штамм ($n=4$);

отрезки отклонений = СОС.

Фиг. 11 представляет собой набор графиков, показывающих рост, давление в незаполненном объеме и профили метаболитов *C. autoethanogenum* ЦТ и aor1+2 КО штамма t в присутствии 60 mM ацетата и 200 кПа СО.

(A) Профиль роста.

(B) Изменение давления в незаполненном объеме.

(C) Профиль ацетата.

(D) Профиль этанола.

(E) Профиль 2,3-бутандиола.

(F) Профиль лактата.

Круги = ДТ;

квадраты = aor1+2 КО штамм;

$n=3$;

отрезки отклонений = СОС.

На фиг. 12 представлен набор графиков, показывающих рост, давление в незаполненном объеме и профили метаболитов *C. autoethanogenum* ЦТ и aor1+2 КО в присутствии 40 mM пропионата и 200 кПа СО.

- (A) Профиль роста.
 - (B) Изменение давления в незаполненном объеме.
 - (C) Профиль ацетата.
 - (D) Профиль этанола.
 - (E) Профиль 2,3-бутандиола.
 - (F) Профиль лактата.
 - (G) Профиль пропионата.
 - (H) Профиль 1-пропанола.
- Круги = ДТ;
 квадраты = аог1+2 КО штамм;
 n=3;
 отрезки отклонений = СОС.

Фиг. 13 представляет собой набор графиков, показывающих рост, давление в незаполненном объеме и профили метаболитов *S. autoethanogenum* ДТ и аог1+2 КО в присутствии 40 мМ бутирата и 200 кПа СО.

- (A) Профиль роста.
 - (B) Изменение давления в незаполненном объеме.
 - (C) Профиль ацетата.
 - (D) Профиль этанола.
 - (E) Профиль 2,3-бутандиола.
 - (F) Профиль лактата.
 - (G) Профиль пропионата.
 - (H) Профиль 1-пропанола.
- Круги = ДТ;
 квадраты = аог1+2 КО штамм;
 n=3;
 отрезки отклонений = СОС.

Фиг. 14 представляет собой набор графиков, показывающих профили роста и метаболитов штаммов *S. autoethanogenum* ДТ и adhE КО на фруктозе.

- (A) Профиль роста.
 - (B) Профиль ацетата.
 - (C) Профиль этанола.
 - (D) Профиль 2,3-бутандиола.
- Круги = ДТ (n=4);
 треугольники = adhE1a КО штамм (n=3);
 перевернутые треугольники = adhE1b КО штамм (n=3);
 квадраты = adhE2 КО штамм (n=3);
 отрезки отклонений = СОС.

Фиг. 15 представляет собой набор графиков, показывающих профили метаболитов и adhE2 транскрипта, штаммов *S. autoethanogenum* ДругЕ и ΔadhE1mut на фруктозе.

- (A) Профиль роста.
 - (B) Профиль ацетата.
 - (C) Профиль этанола.
 - (D) Относительный профиль мРНК adhE2.
- Круги = ДругЕ (n=3);
 квадраты = ΔadhE1mut (n=3);
 отрезки отклонений = СОС.

Фиг. 16 представляет собой набор графиков, показывающих профили роста и метаболитов штаммов *S. autoethanogenum* ДТ и adhE КО на СО.

- (A) Профиль роста.
 - (B) Профиль ацетата.
 - (C) Профиль этанола.
 - (D) Профиль 2,3-бутандиола.
- Круги = ДТ (n=4);
 треугольники = adhE1a КО штамм (n=3);
 перевернутые треугольники = adhE1b КО штамм (n=2);
 квадраты = adhE2 КО штамм (n=3);
 отрезки отклонений = СОС.

Фиг. 17 представляет собой набор графиков, показывающих профили роста и метаболитов штаммов *S. autoethanogenum* ДругЕ и ΔadhE1mut на 200 кПа СО.

- (A) Профиль роста.

- (B) Профиль ацетата.
 (C) Профиль этанола.
 (D) Профиль 2,3-бутандиола.
 Круги = ДругЕ (n=3);
 квадраты = Δ adhE1mut (n=3);
 отрезки отклонений = СОС.

Подробное описание изобретения

Многие микроорганизмы полагаются на ферментативную конверсию кислот в альдегиды для поддержания основных метаболических функций. Альдегид:ферредоксин оксидоредуктаза (AOR) (EC 1.2.7.5) выполняет эту функцию в ряде архей и бактерий, катализируя реакцию кислоты, такой как уксусная кислота (ацетат), и восстановленного ферредоксина с образованием альдегида, такого как ацетальдегид, и окисленного ферредоксина.

AOR особенно важен для продуцирующих этанол микроорганизмов Вуда-Льонгдала. Путь Вуда-Льонгдала, также известный как восстановительный ацетил-СоА путь, является единственным линейным путем фиксации CO_2 в ацетил-СоА (Drake, Ann. NY Acad. Sci., 1125:100-128, 2008) и считается наиболее эффективным механизмом нефотосинтетической фиксации углерода (Fast, Curr. Opin. Chem. Eng., 1:380-395, 2012). Вкратце путь Вуда-Льонгдала состоит из двух ветвей: метильной (восточной) и карбонильной (западной) ветви (фиг. 1). В метильной ветви CO_2 восстанавливается до формиата. Затем формиат активируется конденсацией с тетрагидрофолатом (ТГФ) с образованием формил-ТГФ и потреблением одной молекулы АТФ. В ходе нескольких реакций формил-ТГФ восстанавливается до метил-ТГФ. На заключительном этапе метильной ветви метильная группа переносится в кориноидный железосеросодержащий белок (CoFeSP), а затем сливается с молекулой СО из карбонильной ветви с образованием ацетил-СоА через бифункциональный комплекс дегидрогеназы монооксида углерода/ацетил-СоА-синтазы (CODH/ACS). При автотрофном выращивании на СО, CO_2 , необходимый для метильной ветви, генерируется реакцией превращения водяного-газа, катализируемой CODH. Аналогично при автотрофном росте на CO_2 СО образуется из CO_2 с помощью CODH в карбонильной ветви.

В частности, путь биосинтеза этанола в продуцентах ацетогенных этанолов состоит из двух основных путей (фиг. 1):

(i) прямого двухэтапного последовательного восстановления ацетил-СоА в этанол через ацетальдегид с использованием двухфункциональной альдегид-алкогольдегидрогеназы (AdhE) или альдегиддегидрогеназы (Ald) и алкогольдегидрогеназы (Adh), как обнаружено в других продуцирующих этанол бактериях, включая *E. coli* (Membrillo-Hernandez, J. Bacteriol., 181:7571-7579, 1999); и

(ii) непрямого пути, который протекает через ацетат, и использует альдегид:ферредоксин оксидоредуктазу (AOR), чтобы сначала восстановить ацетат до ацетальдегида перед синтезом этанола через Adh (Körke, PNAS USA, 107:13087-13092, 2010; Mock, J. Bacteriol., 197:2965-2980, 2015).

Одно из ключевых различий между двумя путями биосинтеза этанола заключается в том, что не прямой путь восстанавливает ацетат, который обычно считается нежелательным побочным продуктом в промышленных ферментациях, поскольку он ограничивает выход продуктов и, как известно, токсичен при повышенных концентрациях. Все естественно изолированные ацетогены образуют ацетат, поскольку он обеспечивает преимущество за счет сохранения одного АТФ на моль ацетата через фосфорилирование уровня субстрата (SLP), что является существенным в условиях ограниченной доступности АТФ при автотрофном росте. Термодинамические и стехиометрические анализы демонстрируют, что при ацетогенном росте *C. autoethanogenum* на $\text{H}_2 + \text{CO}_2$ выход АТФ составляет всего 0,5 АТФ/моль этанола через восстановление ацетил-СоА до ацетальдегида, по сравнению с 1,2 АТФ/моль этанола через восстановление ацетата до этанола (Mock, J. Bacteriol., 197:2965-2980, 2015).

Соответственно не прямое продуцирование этанола с помощью AOR дает преимущества, связанные как с экономией энергии, так и с восстановлением ацетата по сравнению с прямым продуцированием этанола с помощью альдегиддегидрогеназы и алкогольдегидрогеназы. Поскольку этот фермент играет такую ключевую роль в метаболизме, разрушение AOR никогда ранее не было продемонстрировано ни в каких бактериальных видах. Удивительно однако, что изобретатели обнаружили, что генетическая модификация бактерии для уменьшения или устранения активности AOR делает бактерии более подходящими для производства определенных типов продуктов.

В частности, уменьшение или устранение активности AOR уменьшает превращение углерода в этанол и увеличивает превращение углерода в другие неэтанольные продукты. Например, микроорганизм по данному изобретению может быть использован для производства одного или большего количества продуктов, выбранных из группы, состоящей из ацетил-СоА, ацетоацетил-СоА, ацетоацетата, ацетона, изопропанола, 3-гидроксиизовалерил-СоА, 3-гидроксиизовалерата, изобутилена, изопрена, 3-гидроксибутирил-СоА, 3-гидроксибутирата, 3-гидроксибутирилового альдегида, 1,3-бутандиола, 2-гидроксиизобутирил-СоА, 2-гидроксиизобутирата, пирувата, ацетолактата, ацетоина, 2,3-бутандиола и лактата.

Определения и уровень техники.

Термин "не встречающийся в природе" при использовании в отношении микроорганизма означает, что микроорганизм был модифицирован рукой человека и имеет по меньшей мере одну генетическую модификацию, не обнаруженную во встречающемся в природе штамме эталонных видов, т.е. не обнаруженную в штамме дикого типа эталонных видов.

Термины "генетическая модификация", "генетическое изменение" или "генная инженерия" в целом относятся к манипулированию геномом или нуклеиновыми кислотами микроорганизма. Аналогично термин "генно-инженерный" относится к микроорганизму, содержащему измененный геном или нуклеиновые кислоты. Методы генетической модификации включают, например, экспрессию гетерологичных генов, вставку или делецию гена или промотора, мутацию нуклеиновой кислоты, измененную экспрессию или инактивацию гена, инженерию ферментов, направленную эволюцию, основанное на знаниях конструирование, методы случайного мутагенеза, перетасовку генов и оптимизацию кодонов.

Термин "рекомбинантный" указывает на то, что нуклеиновая кислота, белок или микроорганизм являются продуктом генетической модификации, инженерии или рекомбинации. Как правило, термин "рекомбинантный" относится к нуклеиновой кислоте, белку или микроорганизму, которые содержат или кодируются генетическим материалом, полученным из нескольких источников, таких как два или более различных штамма или вида микроорганизмов. Используемый в данном документе термин "рекомбинантный" также может быть использован для описания микроорганизма, который содержит мутантную нуклеиновую кислоту или белок, включая мутированную форму эндогенной нуклеиновой кислоты или белка.

Термин "дикий тип" относится к типичной форме организма, штамму, гену или характеристике, встречающейся в природе, в отличие от мутантных или вариантных форм.

Термин "эндогенный" относится к нуклеиновой кислоте или белку, который присутствует или экспрессируется в микроорганизме дикого типа или исходном микроорганизме, из которого получен микроорганизм по данному изобретению. Например, эндогенный ген представляет собой ген, который изначально присутствует в микроорганизме дикого типа или исходном микроорганизме, из которого получен 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, которые отсутствуют в микроорганизме дикого типа или исходном микроорганизме, из которого получен микроорганизм по данному изобретению. В одном варианте осуществления данного изобретения экзогенный ген или фермент могут быть получены из гетерологичного (т.е. другого) штамма или вида и введены в или экспрессированы в микроорганизме по данному изобретению. В другом варианте осуществления данного изобретения экзогенный ген или фермент могут быть искусственно или рекомбинантно созданы и введены в или экспрессированы в микроорганизме по данному изобретению. Экзогенные нуклеиновые кислоты могут быть адаптированы для интеграции в геном микроорганизма по данному изобретению или для того, чтобы оставаться во внехромосомном состоянии в микроорганизме по данному изобретению, например в плазмиде.

Термины "полинуклеотид", "нуклеотид", "нуклеотидная последовательность", "нуклеиновая кислота" и "олигонуклеотид" используются взаимозаменяемо. Они относятся к полимерной форме нуклеотидов любой длины, либо дезоксирибонуклеотидам, либо рибонуклеотидам или их аналогам. Полинуклеотиды могут иметь любую трехмерную структуру и могут выполнять любую известную или неизвестную функцию. Ниже приведены неограничивающие примеры полинуклеотидов: кодирующие или некодирующие области гена или фрагмента гена, локусы(локус), определенные из анализа сцепления, экзоны, интроны, матричная РНК (мРНК), передающая РНК, рибосомная РНК, короткая интерферирующая РНК (siRNA), короткая шпилевидная РНК (shRNA), микроРНК (miRNA), рибозимы, кДНК, рекомбинантные полинуклеотиды, разветвленные полинуклеотиды, плазмиды, векторы, изолированная ДНК любой последовательности, изолированная РНК любой последовательности, зонды нуклеиновых кислот и праймеры. Полинуклеотид может содержать один или большее количество модифицированных нуклеотидов, таких как метилированные нуклеотиды или нуклеотидные аналоги. Если присутствует, модификации нуклеотидной структуры могут быть внесены до или после сборки полимера. Последовательность нуклеотидов может быть прервана ненуклеотидными компонентами. Полинуклеотид может быть дополнительно модифицирован после полимеризации, например, путем конъюгации с компонентом-меткой.

Используемый в данном документе термин "экспрессия" относится к процессу, посредством которого полинуклеотид транскрибируется с ДНК-матрицы (в мРНК или другой РНК-транскрипт) и/или процесс, посредством которого транскрибированная мРНК затем транслируется в пептиды, полипептиды, или белки. Транскрипты и кодированные полипептиды могут в совокупности упоминаться как "генные продукты".

Термины "полипептид", "пептид" и "белок" в данном документе взаимозаменяемы для обозначения полимеров аминокислот любой длины. Полимер может быть линейным или разветвленным, он может содержать модифицированные аминокислоты и может быть прерван неаминокислотами. Указанные термины также включают модифицированный аминокислотный полимер; например, образование дисульфидной связи, гликозилирование, липидацию, ацетилирование, фосфорилирование или любые другие

манипуляции, такие как конъюгация с компонентом-меткой. Используемый в данном документе термин "аминокислота" включает природные и/или неприродные или синтетические аминокислоты, включая глицин и оба оптических изомера D или L, а также аминокислотные аналоги и пептидомиметики.

"Ферментативная активность" или просто "активность" относится в целом к ферментативной активности, включая, но не ограничиваясь ими, активность фермента, количество фермента или доступность фермента для катализирования реакции. Соответственно "увеличение" активности фермента включает в себя увеличение активности фермента, увеличение количества фермента или увеличение доступности фермента для катализирования реакции. Аналогичным образом "уменьшение" активности фермента включает в себя уменьшение активности фермента, уменьшение количества фермента или уменьшение доступности фермента для катализации реакции.

Термин "мутированный" относится к нуклеиновой кислоте или белку, который был модифицирован в микроорганизме по данному изобретению по сравнению с микроорганизмом дикого типа или исходным микроорганизмом, из которого получен микроорганизм по данному изобретению. В одном варианте осуществления данного изобретения мутация может быть делецией, вставкой или заменой в гене, кодирующем фермент. В другом варианте осуществления данного изобретения мутация может быть делецией, вставкой или заменой одной или нескольких 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. Разрушающей мутацией может быть нокаут-мутация (КО). Разрушающей мутацией может быть любая мутация, которая уменьшает, предотвращает или блокирует биосинтез продукта, продуцируемого ферментом. В микроорганизмах с многими изоформами фермента может быть введена одна или большее количество разрушающих мутаций для уменьшения или устранения экспрессии или активности одной изоформы, двух или более изоформ или всех изоформ фермента. Разрушающая мутация может включать, например, мутацию в гене, кодирующем фермент, мутацию в генетическом регуляторном элементе, участвующем в экспрессии гена, кодирующего фермент, введение нуклеиновой кислоты, которая продуцирует белок, который уменьшает или ингибирует активность фермента или введение нуклеиновой кислоты (например, антисмысловой РНК, миРНК (siRNA), CRISPR) или белка, который ингибирует экспрессию фермента. Разрушающая мутация может быть введена любым способом, известным в данной области техники.

Введение разрушающей мутации приводит к получению микроорганизма по данному изобретению, который не образует ацетальдегид и/или этанол, или по существу не образует ацетальдегид и/или этанол, или образует уменьшенное количество ацетальдегида и/или этанола по сравнению с исходным микроорганизмом, от которого является производным микроорганизм по данному изобретению. Например, микроорганизм по данному изобретению может не продуцировать ацетальдегид и/или этанол или продуцировать по меньшей мере на около 1, 3, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или на 95% меньше ацетальдегида и/или этанола, чем исходный микроорганизм. Например, микроорганизм по данному изобретению может продуцировать менее чем около 0,001, 0,01, 0,10, 0,30, 0,50 или 1,0 г/л ацетальдегида и/или этанола.

Термин "варианты" включает нуклеиновые кислоты и белки, последовательность которых отличается от последовательности эталонной нуклеиновой кислоты и белка, такой как последовательность эталонной нуклеиновой кислоты и белка, раскрытая в предшествующем уровне техники или проиллюстрированная в данном документе примерами. Изобретение может быть осуществлено на практике с использованием 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 одну и ту же функцию или катализировать по существу ту же реакцию, что и контрольный белок. Вариантный ген может кодировать тот же или по существу тот же самый белок, что и эталонный ген. Вариантный промотор может иметь по существу такую же способность стимулировать экспрессию одного или большего количества генов как и эталонный промотор.

Термин "микроорганизм" обозначает микроскопический организм, особенно бактерии, археи, вирусы или грибы. Микроорганизм по данному изобретению обычно представляет собой бактерию. Используемый в данном документе термин "микроорганизм" также подразумевает "бактерии".

Термин "исходный микроорганизм" представляет собой микроорганизм, используемый для получения микроорганизма по данному изобретению. Исходный микроорганизм может быть встречающимся в природе микроорганизмом (т.е. микроорганизмом дикого типа) или микроорганизмом, который был ранее модифицирован (т.е. мутантным или рекомбинантным микроорганизмом). Микроорганизм по данному изобретению может быть модифицирован для экспрессии или сверхэкспрессии одного или большего количества ферментов, которые не были экспрессированы или сверхэкспрессированы в исходном микроорганизме. Аналогичным образом, микроорганизм по данному изобретению может быть модифицирован, чтобы содержать один или большее количество генов, которые не содержались в исходном микроорганизме. Микроорганизм по данному изобретению также может быть модифицирован, чтобы не экспрессировать или экспрессировать более низкие количества одного или большего количества ферментов, которые были экспрессированы в исходном микроорганизме.

Микроорганизм по данному изобретению может быть дополнительно классифицирован на основе функциональных и/или структурных характеристик. Например, микроорганизм по данному изобретению может представлять собой или может является производным от С1-фиксирующего микроорганизма, анаэроба, ацетогена, этанологена, карбоксидотрофа и/или метанотрофа. В табл. 1 представлен репрезентативный список микроорганизмов, в котором указаны некоторые их функциональные и структурные характеристики.

Таблица 1

	С1 - фи кси ру ю ща я	Ан аз ро б	Ац ет оге н	Эт ан оге н	Ав тот ро ф	Ка рб окс ит ро ф	Ме та но тр оф	AOR (ЕС 1.2.7. 5)	AdhE (ЕС 1.2.1.10 /ЕС 1.1.1.1)
<i>Acetobacterium woodii</i>	+	+	+	+/- ¹	-	-	-	-	+
<i>Alkalibaculum bacchii</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+/- ⁷
<i>Blautia producta</i>	+	+	+	-	+	+	-	+/- ⁷	+/- ⁷
<i>Butyribacterium methylotrophicum</i>	+	+	+	+	+	+	-	+/- ⁷	+/- ⁷
<i>Clostridium aceticum</i>	+	+	+	-	+	+	-	+	-
<i>Clostridium autoethanogenum</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+
<i>Clostridium carbonivorans</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+
<i>Clostridium coskatii</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+
<i>Clostridium drakei</i>	+	+	+	-	+	+	-	+/- ⁷	+/- ⁷
<i>Clostridium formicoaceticum</i>	+	+	+	-	+	+	-	+	+/- ⁷
<i>Clostridium ijungdahlii</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+
<i>Clostridium magnum</i>	+	+	+	-	+	+/- ²	-	-	+
<i>Clostridium ragsdalei</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+
<i>Clostridium scatologenes</i>	+	+	+	-	+	+	-	-	+
<i>Eubacterium limosum</i>	+	+	+	-	+	+	-	+	-
<i>Moorella thermoautotrophica</i>	+	+	+	+	+	+	-	+/- ⁷	+/- ⁷
<i>Moorella thermoacetica</i> (ранее <i>Clostridium thermoaceticum</i>)	+	+	+	- ³	+	+	-	+	-
<i>Oxobacter pfennigii</i>	+	+	+	-	+	+	-	-	-
<i>Sporomusa ovata</i>	+	+	+	-	+	+/- ⁴	-	+	-
<i>Sporomusa silvacetica</i>	+	+	+	-	+	+/- ⁵	-	+/- ⁷	+/- ⁷
<i>Sporomusa sphaeroides</i>	+	+	+	-	+	+/- ⁶	-	+/- ⁷	+/- ⁷
<i>Thermoanaerobacter kiuvi</i>	+	+	+	-	+	-	-	-	-

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

² Не было исследовано, может ли *Clostridium magnum* расти на CO.

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

⁴ Не было исследовано, может ли *Sporomusa ovata* расти на CO.

⁵ Не было исследовано, может ли *Sporomusa silvacetica* расти на CO.

⁶ Не было исследовано, может ли *Sporomusa sphaeroides* расти на CO.

⁷ В настоящее время неизвестно, присутствует ли этот фермент у этого вида.

"C1" относится к молекуле с одним углеродом, например CO, CO₂, CH₄ или CH₃OH. "C1-оксигенат" относится к молекуле с одним углеродом, которая также содержит по меньшей мере один атом кислорода, например CO, CO₂ или CH₃OH.

"C1 источник углерода" относится к молекуле, содержащей один углерод, которая служит в качестве частичного или единственного источника углерода для микроорганизма по данному изобретению. Например, C1 источник углерода может содержать один или большее количество из CO, CO₂, CH₄, CH₃OH или CH₂O₂. Предпочтительно C1 источник углерода содержит один или оба CO и CO₂. "C1-фиксирующий микроорганизм" представляет собой микроорганизм, который обладает способностью продуцировать один или большее количество продуктов из C1 источника 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 табл. 1.

Термин "анаэроб" обозначает микроорганизм, который не требует кислорода для роста. Анаэроб может реагировать отрицательно или даже умереть, 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 табл. 1.

Термин "ацетоген" обозначает микроорганизм, который продуцирует или способен продуцировать ацетат (или уксусную кислоту) в качестве продукта анаэробного дыхания. Как правило, ацетогены являются облигатно анаэробными бактериями, которые используют путь Вуда-Льюнгаля в качестве основного механизма для сохранения энергии и для синтеза продуктов, производных от ацетил-СоА и ацетил-СоА, таких как ацетат (Ragsdale, Biochim. Biophys. Acta., 1784:1873-1898, 2008). Ацетогены используют путь ацетил-СоА как

- (1) механизм восстановительного синтеза ацетил-СоА из CO₂,
- (2) терминальный электрон-акцепторный процесс сохранения энергии,
- (3) механизм фиксации (ассимиляции) CO₂ при синтезе клеточного углерода (Drake, Acetogenic Prokaryotes, In: The Prokaryotes, 3rd edition, p. 354, New York, NY, 2006).

Все встречающиеся в природе ацетогены являются C1-фиксирующими, анаэробными, автотрофными и неметанотрофными. Как правило, микроорганизм по данному изобретению представляет собой ацетоген. В предпочтительном варианте осуществления данного изобретения микроорганизм по данному изобретению является производным от ацетогена, указанного в табл. 1.

Термин "этанологен" обозначает микроорганизм, который продуцирует или способен продуцировать этанол. В некоторых вариантах осуществления микроорганизм по данному изобретению является этанологеном. В предпочтительном варианте осуществления данного изобретения микроорганизм по данному изобретению является производным от этанологена, указанного в табл. 1. Однако, поскольку AOR и AdhE участвуют в биосинтезе этанола, разрушение AOR и/или AdhE микроорганизма может привести к изменению фенотипа в отношении производства этанола.

Термин "автотроф" обозначает микроорганизм, способный расти в отсутствие органического углерода. Вместо этого автотрофы используют неорганические источники углерода, такие как CO и/или CO₂. Как правило, микроорганизм по данному изобретению является автотрофом. В предпочтительном варианте осуществления данного изобретения микроорганизм по данному изобретению является производным от автотрофа, указанного в табл. 1.

Термин "карбоксидотроф" обозначает микроорганизм, способный использовать CO в качестве единственного источника углерода. Как правило, микроорганизм по данному изобретению представляет собой карбоксидотроф. В предпочтительном варианте осуществления данного изобретения микроорганизм по данному изобретению является производным от карбоксидотрофа, указанного в табл. 1.

Термин "метанотроф" обозначает микроорганизм, способный использовать метан в качестве единственного источника углерода и энергии. В некоторых вариантах осуществления микроорганизм по данному изобретению представляет собой метанотроф или является производным от метанотрофа. В других вариантах осуществления микроорганизм по данному изобретению не является метанотрофом или не является производным от метанотрофа.

Исходный микроорганизм, из которого получен микроорганизм по данному изобретению, обычно содержит фермент, который катализирует реакцию, определяемую ЕС 1.2.7.5. Этот фермент отвечает за превращение кислот в их соответствующие альдегиды. Более конкретно, этот фермент катализирует конверсию карбоксилат+2H⁺+2 восстановленный ферредоксин в альдегид+H₂O+2 окисленный ферредоксин. В предпочтительном варианте осуществления данного изобретения фермент, который катализирует эту реакцию, представляет собой AOR.

В ацетогенах активность AOR может быть связана с окислением CO (через CO-дегидрогеназу CO, ЕС 1.2.7.4) или водорода (через ферредоксин-зависимую гидрогеназу, ЕС 1.12.7.2 или 1.12.1.4), что в обоих случаях приводит к получению восстановленного ферредоксина (Körpke, Curr. Opin. Biotechnol., 22:320-325, 2011; Körpke, PNAS USA, 107:13087-13092, 2010). Например, геном *C. autoethanogenum* кодирует две изоформы aor (CAETHG_0092 и 0102) и два гена adhE (CAETHG_3747 и 3748), которые нахо-

дятся в тандеме и потенциально являются результатом дубликации генов (Brown, Biotechnol. Biofuels., 7:1-18, 2014). Такое же расположение также присутствует в *C. ljungdahlii* (Köpke, PNAS USA, 107:13087-13092, 2010; Leang, Appl. Environ. Microbiol., 79:1102-1109, 2013).

Предпочтительно исходный микроорганизм представляет собой бактерию, выбранную из группы, состоящей из *Alkalibaculum bacchi*, *Blautia producta*, *Butyribacterium methylotrophicum*, *Chloroflexus aurantiacus*, *Clostridium aceticum*, *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium carboxidivorans*, *Clostridium coskatii*, *Clostridium drakei*, *Clostridium formicoaceticum*, *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium ragsdalei*, *Desulfovibrio vulgaris*, *Eubacterium limosum*, *Geobacter sulfurreducens*, *Methylomicrobium alcaliphilum*, *Moorella thermoautotrophica*, *Moorella thermoacetica*, *Rhodospirillum rubrum*, *Sporomusa ovata*, *Sporomusa silvacetica*, *Sporomusa sphaeroides*, *Thermanaerovibrio acidaminovorans*, *Thermanaerovibrio acidaminovorans*, *Thermanaerobacter wiegelii*, *Thermodesulfovibrio yellowstonii*, *Thermodesulfovibrio yellowstonii*, и *Thermus thermophilus*. В одном варианте осуществления данного изобретения исходный микроорганизм представляет собой *Clostridium autethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium ragsdalei* или *Clostridium coskatii*. В предпочтительном варианте осуществления данного изобретения исходный микроорганизм представляет собой *Clostridium autethanogenum* LZ1561, который был заложен на хранение 7 июня 2010 г. в депозитарий Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ)), расположенный на Инхофенштрассе 7B, D-38124 Брауншвейг, Германия, 7 июня 2010 г. по условиям Будапештского договора и ему был присвоен депозитный номер DSM23693.

Термин "является производным от" указывает на то, что нуклеиновая кислота, белок или микроорганизм модифицированы или адаптированы из другой (например, исходной или дикого типа) нуклеиновой кислоты, белка или микроорганизма, чтобы получить новую нуклеиновую кислоту, белок или микроорганизм. 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 исходного микроорганизма, выбранного из группы, состоящей из *Alkalibaculum bacchi*, *Blautia producta*, *Butyribacterium methylotrophicum*, *Chloroflexus aurantiacus*, *Clostridium aceticum*, *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium carboxidivorans*, *Clostridium coskatii*, *Clostridium drakei*, *Clostridium formicoaceticum*, *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium ragsdalei*, *Desulfovibrio vulgaris*, *Eubacterium limosum*, *Geobacter sulfurreducens*, *Methylomicrobium alcaliphilum*, *Moorella thermoautotrophica*, *Moorella thermoacetica*, *Rhodospirillum rubrum*, *Sporomusa ovata*, *Sporomusa silvacetica*, *Sporomusa sphaeroides*, *Thermanaerovibrio acidaminovorans*, *Thermanaerovibrio acidaminovorans*, *Thermanaerobacter wiegelii*, *Thermodesulfovibrio yellowstonii*, *Thermodesulfovibrio yellowstonii*, и *Thermus thermophilus*. В одном варианте осуществления данного изобретения микроорганизм по данному изобретению является производным от *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium ragsdalei* или *Clostridium coskatii*. В предпочтительном варианте осуществления данного изобретения микроорганизм по данному изобретению является производным от *Clostridium autoethanogenum* LZ1561, который заложен в депозитарий под депозитным номером DSMZ DSM23693.

В следующей таблице приведен примерный список микроорганизмов, содержащих гены/ферменты AOR.

Фермент	Микроорганизм	Депозитный номер	GeneID
AOR	<i>Alkalibaculum bacchi</i>		
AOR	<i>Blautia producta</i>	NZ_ARET00000000	
		.1	
AOR	<i>Butyribacterium methylotrophicum</i>		
AOR	<i>Chloroflexus aurantiacus J-10-fl</i>	NC_010175.1	5828639
AOR	<i>Clostridium aceticum</i>		
AOR	<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824	NC_003030.1	1118201
AOR	<i>Clostridium autoethanogenum</i>	NC_022592.1	CAETHG_0092
AOR	<i>Clostridium autoethanogenum</i>	NC_022592.1	CAETHG_0102
AOR	<i>Clostridium botulinum</i> A str. san	NC_009698.1	5400593
AOR	<i>Clostridium carbonivorans</i>		
AOR	<i>Clostridium coskatii</i>		
AOR	<i>Clostridium drakei</i>		
AOR	<i>Clostridium formicoaceticum</i>		
AOR	<i>Clostridium ljungdahlii</i>	NC_014328.1	CLJU_c20110
AOR	<i>Clostridium ljungdahlii</i>	NC_014328.1	CLJU_c20210

AOR	<i>Clostridium ragsdalei</i>		
AOR	<i>Desulfovibrio vulgaris str. Hildenborough</i>	NC_002937.3	2796664
AOR	<i>Desulfovibrio vulgaris str. Hildenborough</i>	NC_002937.3	2795337
AOR	<i>Eubacterium limosum</i>	NC_014624.2	ELI_1752
AOR	<i>Geobacter serreducens PCA</i>	NC_002939.5	2685730
AOR	<i>Geobacter serreducens PCA</i>	NC_002939.5	2687039
AOR	<i>Methylobacterium alcaliphilum 20Z</i>	NC_016112.1	11361147
AOR	<i>Moorella thermoautrophica</i>	CP012369.1	Moth_0154
AOR	<i>Moorella thermoautrophica</i>	CP012369.1	Moth_2300
AOR	<i>Moorella thermoautrophica</i>	CP012369.1	Moth_0722
AOR	<i>Moorella thermoacetica ATCC 39073</i>	NC_007644.1	3831332
AOR	<i>Moorella thermoacetica ATCC 39073</i>	NC_007644.1	3830998
AOR	<i>Moorella thermoacetica ATCC 39073</i>	NC_007644.1	3831866
AOR	<i>Rhodospirillum rubrum ATCC 11170</i>	NC_007643.1	3833668
AOR	<i>Sporomusa ovata</i>		
AOR	<i>Sporomusa silvacetica</i>		
AOR	<i>Sporomusa sphaeroides</i>		
AOR	<i>Thermanaerovibrio acidaminovorans</i> DSM 6589	NC_013522.1	8630284
AOR	<i>Thermanaerovibrio acidaminovorans</i> DSM 6589	NC_013522.1	8630027
AOR	<i>Thermanaerovibrio acidaminovorans</i> DSM 6589	NC_013522.1	8630623
AOR	<i>Thermoanaerobacter wiegellii Rt8.B1</i>	NC_015958.1	11082596
AOR	<i>Thermodesulfovibrio yellowstonii</i>	NC_011296.1	6941429
AOR	<i>Thermodesulfovibrio yellowstonii</i>	NC_011296.1	6943174
AOR	<i>Thermodesulfovibrio yellowstonii</i>	NC_011296.1	6941905
AOR	<i>Thermus thermophilus HB8</i>	NC_006461.1	3168554
AOR	<i>Thermus thermophilus HB8</i>	NC_006461.1	3168612

В предпочтительном варианте осуществления данного изобретения микроорганизм по данному изобретению является производным от кластера Clostridia, включающего виды *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium ragsdalei* и *Clostridium coskatii*. Эти виды впервые были 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 виды имеют много общего. В частности, эти виды являются все C1-фиксирующими, анаэробными, ацетогенными, этанологенными и карбоксидотрофными членами рода *Clostridium*. Эти виды имеют сходные генотипы и фенотипы и способы сохранения энергии и ферментативного метаболизма. Более того, эти виды группируются в группу гомологии кластридиальной рРНК1, характеризующуюся ДНК, кодирующей 16S рРНК, которая более чем на 99% идентична, содержанием G+C ДНК около 22-30 мол.%, грампозитивностью, сходной морфологией и размером (логарифмические растущие клетки от 0,5 до 0,7×3-5 мкм), мезофильностью (оптимально растут при 30-37°C), сходными диапазонами pH около 4-7,5 (при оптимальном pH около 5,5-6), отсутствием цитохромов и консервацией энергии через комплекс Rnf. Кроме того, для этих видов было показано восстановление карбоновых кислот в их соответствующие спирты (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 образуются небольшие количества 2,3-бутандиола и молочной кислоты.

Однако эти виды также имеют ряд отличий. Эти виды были выделены из разных источников: *Clostridium autoethanogenum* из кишечника кролика, *Clostridium ljungdahlii* из отходов курятника и *Clostridium ragsdalei* из пресноводного осадка. 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 различаются в ауксотро-

фии к некоторым витаминам (например, тиамину, биотину). Эти виды имеют различия в нуклеиновых и аминокислотных последовательностях генов и белков пути Вуда-Льонгдала, хотя было показано, что общая организация и количество этих генов и белков является одинаковой у всех видов (Körpe, Curr. Opin. Biotechnol., 22:320-325, 2011).

Таким образом, в целом, многие характеристики *Clostridium autethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium ragsdalei* или *Clostridium coskatii* не являются специфическими для этих видов, но являются довольно общими характеристиками для этого кластера С1-фиксирующих, анаэробных, ацетогенных, этанологенных и карбоксидотрофных членов рода *Clostridium*. Однако, поскольку эти виды по сути различны, генетическая модификация или манипуляция одним из этих видов может не иметь одинакового эффекта у другого из этих видов. Например, могут наблюдаться различия в росте, производительности или продуцировании продукта.

Микроорганизм по данному изобретению также может быть производным от изолята или мутанта *Clostridium autethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium ragsdalei* или *Clostridium coskatii*. Изоляты и мутанты *Clostridium autoethanogenum* включают JA1-1 (DSM10061) (Abrini, Arch. Microbiol., 161:345-351, 1994), LBS1560 (DSM19630) (WO 2009/064200) и LZ1561 (DSM23693). Изоляты и мутанты *Clostridium ljungdahlii* включают 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), 0-52 (ATCC 55989) (US 6368819) и ОТА-1 (Tirado-Acevedo, Production of bioethanol from synthesis gas using *Clostridium ljungdahlii*, PhD диссертация, Университет штата Северная Каролина, 2010). Изоляты и мутанты *Clostridium ragsdalei* включают PI 1 (ATCC BAA-622, ATCC PTA-7826) (WO 2008/028055).

Дополнительно или альтернативно исходный микроорганизм, из которого получают микроорганизм по данному изобретению, может содержать фермент, который катализирует реакцию, определяемую ЕС 1.2.1.10/ЕС 1.1.1.1, например AdhE. Микроорганизм согласно данному изобретению может иметь уменьшенную или устраненную активность по меньшей мере одного фермента, который катализирует реакцию, определяемую ЕС 1.2.1.10 и/или ЕС 1.1.1.1, по сравнению с исходной бактерией, путем наличия по меньшей мере одной разрушающей мутации в гене, кодирующем фермент, который катализирует реакцию, определяемую ЕС 1.2.1.10 и/или ЕС 1.1.1.1. Фермент, который катализирует реакцию, определяемую ЕС 1.2.1.10 и/или ЕС 1.1.1.1, предпочтительно выбирают из группы, состоящей из бифункциональной альдегид/алкогольдегидрогеназы, альдегиддегидрогеназы и алкогольдегидрогеназы. Нарушение экспрессии одного или большего количества из этих ферментов может дополнительно направлять синтез углерода от этанола и к продуктам отличным от этанола.

Термин "субстрат" относится к углероду и/или источнику энергии для микроорганизма по данному изобретению. Как правило, субстрат является газообразным и содержит С1 источник углерода, например СО, СО₂ и/или СН₄. Предпочтительно субстрат содержит С1 источник углерода СО или СО+СО₂. Субстрат может дополнительно содержать другие не углеродные компоненты, такие как Н₂, N₂ или электроны. В некоторых вариантах осуществления субстрат может также содержать углеводы, такие как глюкоза или лигноцеллюлоза.

Субстрат обычно содержит по меньшей мере некоторое количество СО, такое как около 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 мол.% СО. Субстрат может содержать диапазон СО, такой как около 20-80, 30-70 или 40-60 мол.% СО. Предпочтительно субстрат содержит около 40-70 мол.% СО (например, газ сталеплавильного завода или домны), около 20-30 мол.% СО (например, основной газ кислородной печи) или около 15-45 мол.% СО (например, синтез-газ). В некоторых вариантах осуществления субстрат может содержать относительно низкое количество СО, например около 1-10 или 1-20 мол.% СО. Микроорганизм по данному изобретению обычно превращает по меньшей мере часть СО в субстрате в продукт. В некоторых вариантах осуществления субстрат не содержит или практически не содержит (<1 мол.%) СО.

Субстрат может содержать некоторое количество Н₂. Например, субстрат может содержать около 1, 2, 5, 10, 15, 20 или 30 мол.% Н₂. В некоторых вариантах осуществления субстрат может содержать относительно высокое количество Н₂, такое как около 60, 70, 80 или 90 мол.% Н₂. В других вариантах осуществления субстрат не содержит или практически не содержит (<1 мол.%) Н₂.

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

Хотя субстрат обычно является газообразным, субстрат также может быть предоставлен в альтернативных формах. Например, субстрат может быть растворен в жидкости, насыщенной СО-содержащим газом, с использованием микропузырькового генератора дисперсии. В качестве дополнительного примера субстрат может адсорбироваться на твердой подложке.

Источником субстрата и/или С1 источником углерода может быть отработанный газ, полученный в качестве побочного продукта промышленного процесса или из какого-либо другого источника, например из автомобильных выхлопных газов или газификации биомассы. В некоторых вариантах осуществления

промышленный процесс выбирают из группы, состоящей из производства изделий из черных металлов, таких как сталеплавильное производство, производство изделий из цветных металлов, нефтепереработка, газификация угля, производство электроэнергии, производство сажи, производство аммиака, производство метанола и производство кокса. В этих вариантах осуществления источник субстрата и/или C1 источник углерода может быть захвачен из промышленного процесса до его выброса в атмосферу с использованием любого удобного метода.

Источником субстрата и/или C1 источником углерода может быть синтез-газ, такой как синтез-газ, полученный путем газификации угля или отходов нефтеперерабатывающего предприятия, газификации биомассы или лигноцеллюлозного материала или риформинг природного газа. В другом варианте осуществления данного изобретения синтез-газ может быть получен из газификации твердых бытовых отходов или твердых промышленных отходов.

Состав субстрата может оказать значительное влияние на эффективность и/или стоимость реакции. Например, присутствие кислорода (O₂) может снизить эффективность анаэробного ферментационного процесса. В зависимости от состава субстрата может быть желательна обработка, растереть или отфильтровать субстрат для удаления любых нежелательных примесей, таких как токсины, нежелательные компоненты или пылевые частицы, и/или увеличения концентрации желаемых компонентов.

Микроорганизм по данному изобретению может быть культивирован для производства одного или большего количества продуктов. Например, *Clostridium autoethanogenum* продуцирует или может быть сконструирован 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 2013/185123), этилена (WO 2012/026833), ацетона (WO 2012/115527), изопропанола (WO 2012/115527), липидов (WO 2013/036147), 3-гидроксипропионата (3-HP) (WO 2013/180581), изопрена и других терпенов (WO 2013/180584), мевалоновой кислоты (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), парагидроксibenзойной кислоты (WO 2016/191625), салицилата (WO 2016/191625), 2-аминобензоата (WO 2016/191625), дигидроксibenзоата (WO 2016/191625), 4-гидроксициклогексанкарбоновой кислоты (WO 2016/191625), 3-гидроксибутирата (WO 2017/066498), 1,3-бутандиол (WO 2017/066498), 2-гидроксиизобутирата (WO 2017/066498), адипиновой кислоты (WO 2017/066498), 1,3-гександиола (WO 2017/066498), 3-метил-2-бутанола (WO 2017/066498), 2-бутен-1-ола (WO 2017/066498), изовалерата (WO 2017/066498) или изоамилового спирта (WO 2017/066498). В дополнение к одному или нескольким из этих продуктов микроорганизм по данному изобретению может также продуцировать этанол, ацетат и/или 2,3-бутандиол. В некоторых вариантах осуществления микробная биомасса сама по себе может считаться продуктом.

Термин "натуральный продукт" обозначает продукт, произведенный генетически немодифицированным микроорганизмом. Например, этанол, ацетат и 2,3-бутандиол являются нативными продуктами *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium ragsdalei* и *Clostridium coskatii*. Термин "ненатуральный продукт" представляет собой продукт, который продуцируется генетически модифицированным микроорганизмом, но не продуцируется генетически немодифицированным (например, исходным) микроорганизмом, из которого получен генетически модифицированный микроорганизм. Пути и ферменты для производства неприродных продуктов могут быть найдены в данной области техники, например, такие как упомянуто выше.

Термин "селективность" относится к отношению продуцирования желаемого продукта к продуцированию всех продуктов ферментации, продуцируемых микроорганизмом. Микроорганизм по данному изобретению может быть сконструирован для производства продуктов с определенной селективностью или с минимальной селективностью. В одном варианте осуществления данного изобретения желаемый продукт содержит по меньшей мере около 5, 10, 15, 20, 30, 50 или 75% всех продуктов ферментации, продуцируемых микроорганизмом по данному изобретению. В одном варианте осуществления данного изобретения желаемый продукт составляет по меньшей мере 10% от всех продуктов ферментации, продуцируемых микроорганизмом по данному изобретению, так что микроорганизм по данному изобретению имеет селективность по желаемому продукту, составляющую по меньшей мере 10%. В другом варианте осуществления данного изобретения желаемый продукт составляет по меньшей мере 30% от всех продуктов ферментации, полученных микроорганизмом по данному изобретению, так что микроорганизм по данному изобретению имеет селективность по желаемому продукту, составляющую по меньшей мере 30%.

Термины "повышение эффективности", "повышенная эффективность" и т.п. включают, но не ограничиваются ими, увеличение темпов роста, темпов продуцирования продукта или объема, объема продукта на объем потребляемого субстрата или селективности продукта. Эффективность может быть изменена относительно характеристик исходного микроорганизма, из которого получен микроорганизм по данному изобретению.

Как правило, культивирование проводят в биореакторе. Термин "биореактор" включает устройство для культивирования/ферментации, состоящее из одного или большего количества сосудов, башен или

трубопроводов, таких как реактор с непрерывным перемешиванием (CSTR), реактор с иммобилизованными клетками (ICR - immobilized cell reactor), проточный реактор (TBR - trickle bed reactor), пузырьчатую колонку, ферментер с подъемом газов, статический смеситель или другой сосуд или другое устройство, подходящее для контакта газ-жидкость. В некоторых вариантах осуществления биореактор может содержать первый реактор выращивания и второй реактор культивирования/ферментации. Субстрат может быть предоставлен для одного или обоих этих реакторов. Используемые в данном документе термины "культура/культивирование" и "ферментация" используются взаимозаменяемо. Эти термины охватывают как фазу роста, так и фазу биосинтеза продукта процесса культивирования/ферментации.

Культуру обычно поддерживают в водной культуральной среде, которая содержит питательные вещества, витамины и/или минералы, достаточные для роста микроорганизма. Предпочтительно водная культуральная среда представляет собой анаэробную микробную среду для 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 получения желаемого продукта. Как правило, культивирование/ферментацию проводят в анаэробных условиях. Учитываемые условия реакции включают давление (или парциальное давление), температуру, скорость потока газа, скорость потока жидкости, pH среды, окислительно-восстановительный потенциал среды, скорость перемешивания (при использовании непрерывного реактора с перемешиванием), уровень инокулята, максимальные концентрации газового субстрата для обеспечения того, чтоб газ в жидкой фазе не становился ограничивающим фактором, и максимальные концентрации продукта для избежания ингибирования продукта. В частности, скорость введения субстрата может контролироваться, чтобы гарантировать, что концентрация газа в жидкой фазе не станет ограничивающей, так как продукты могут потребляться культурой в условиях ограниченного присутствия газа.

Эксплуатация биореактора при повышенном давлении позволяет увеличить скорость переноса массы газа из газовой фазы в жидкую фазу. Соответственно обычно предпочтительно проводить культивирование/ферментацию при давлении выше атмосферного. Кроме того, поскольку определенная скорость конверсии газа частично зависит от времени удерживания субстрата и время удерживания диктует требуемый объем биореактора, использование систем под давлением может значительно уменьшить объем требуемого биореактора и, следовательно, капитальные затраты на культуральное/ферментационное оборудование. Это, в свою очередь, означает, что время удерживания, определяемое как объем жидкости в биореакторе, деленный на скорость потока входного газа, может быть уменьшено, когда биореакторы функционируют при повышенном давлении, а не при атмосферном давлении. Оптимальные условия реакции будут частично зависеть от конкретного используемого микроорганизма. Однако в целом предпочтительнее осуществлять ферментацию при давлении выше атмосферного. Кроме того, поскольку определенная скорость преобразования газа отчасти зависит от времени удерживания субстрата и достижение требуемого времени удерживания, в свою очередь, определяет требуемый объем биореактора, использование систем под давлением может значительно уменьшить объем требуемого биореактора и, следовательно, капитальные затраты на ферментационное оборудование.

В некоторых вариантах осуществления ферментацию проводят в отсутствие света или в присутствии количества света, недостаточного для удовлетворения энергетических потребностей фотосинтезирующих микроорганизмов.

Продукты могут быть отделены или очищены от ферментационного бульона с использованием любого способа или комбинации способов, известных в данной области, включая, например, фракционную перегонку, испарение, первапорацию, газоотвод, разделение фаз и экстрактивную ферментацию, включая, например, жидкостно-жидкостную экстракцию. В некоторых вариантах осуществления продукты извлекают из ферментационного бульона путем непрерывного удаления части бульона из биореактора, отделения микробных клеток от бульона (обычно путем фильтрации) и выделения одного или большего количества продуктов из бульона. Спирты и/или ацетон могут быть извлечены, например, путем дистилляции. Кислоты могут быть извлечены, например, путем адсорбции на активированном угле. Отделенные микробные клетки предпочтительно возвращают в биореактор. Не содержащий клеток пермеат, оставшийся после удаления продуктов, также предпочтительно возвращается в биореактор. Дополнительные питательные вещества (такие как витамины группы B) могут быть добавлены в бесклеточный пермеат для пополнения среды до ее возвращения в биореактор.

Примеры

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

Пример.

Этот пример демонстрирует успешное введение разрушающих мутаций в AOR и алкогольдегидрогеназу в *S. autoethanogenum*.

1.1. Бактериальные штаммы и условия роста.

Бактериальные штаммы, используемые в этом примере, описаны в табл. 2.

Таблица 2

Штамм	Описание/Генотип
<i>Escherichia coli</i> CA434 (НВ101)	Штамм конъюгативного переноса. Штамм НВ101 [<i>thi-l hsdS20</i> (r _b , m _b) <i>supE44 recAB ara-14 leuB5proA2 lacYl galKl rpsL20</i> (Str ^R) <i>xyl-5 mt1-1</i>], несущий плазмиду R702 Tra ⁺ , Mob ⁺ [R702-Tc ^R , Sm ^R , Su ^R , Hg ^R]
<i>Clostridium autoethanogenum</i> DSM 10061	Изолят дикого типа
<i>C. autoethanogenum</i> CauDSM10061- <i>adhE1a</i> -115s::CT	Интрон группы II, направленно вставленный в вышерасположенный Ald-домен локуса гена <i>adhE1</i> (CAETHG_3747)
<i>C. autoethanogenum</i> CauDSM10061- <i>adhE1b</i> -541s::CT	Интрон группы II, направленно вставленный в нижерасположенный Adh-домен локуса гена <i>adhE1</i> (CAETHG_3747)
<i>C. autoethanogenum</i> CauDSM10061- <i>adhE2</i> -662s::CT	Интрон группы II направленно вставленный в локус гена <i>adhE2</i> (CAETHG_3748)
<i>C. autoethanogenum</i> CauDSM10061- <i>aor1</i> -361s::CT	Интрон группы II направленно вставленный в локус гена <i>aor1</i> (CAETHG_0092)
<i>C. autoethanogenum</i> CauDSM10061- <i>aor2</i> -370s::CT	Интрон группы II, направленно вставленный в локус гена <i>aor2</i> (CAETHG_0102)
<i>C. autoethanogenum</i> $\Delta pyrE$ штамм с делецией в рамке считывания	Делеция в рамке считывания в <i>pyrE</i> , созданная с помощью спаренного аллельного обмена (Allele-Coupled Exchange)
<i>C. autoethanogenum</i> $\Delta adhE1$ штамм с делецией в рамке считывания	Делеция в рамке считывания <i>adhE1</i> в штамме $\Delta pyrE$
<i>C. autoethanogenum</i> $\Delta adhE1^{mut}$ штамм с делецией в рамке считывания	Делеция в рамке считывания в <i>adhE1</i> с непреднамеренной делецией промотора <i>adhE2</i> в штамме $\Delta pyrE$
<i>C. autoethanogenum</i> $\Delta adhE1+2$ штамм с делецией в рамке считывания	Делеция в рамке считывания в <i>adhE1</i> и <i>adhE2</i> в штамме $\Delta pyrE$
<i>C. autoethanogenum</i> <i>aor1+2</i> штамм двойного КО	Интрон группы II направленно вставлен в локус гена <i>aor1</i> в штамме $\Delta pyrE$. Затем следует делеция <i>aor2</i> в рамке считывания с использованием опосредованного <i>pyrE</i> -опосредованного аллельного обмена. На последнем этапе <i>pyrE</i> восстанавливали обратно в ДТ

Штаммы *Escherichia coli*, используемые для обычной наработки плазмиды, клонирования и конъюгации, культивировали при 37°C в среде LB в присутствии антибиотиков (25 мкг/мл хлорамфеникола, 100 мкг/мл спектиномицина). *C. autoethanogenum* DSM 10061 был приобретен у Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) GmbH), Брауншвейг, Германия и регулярно культивировался в строгих анаэробных условиях в среде CaGM.

Среда для роста CaGM содержала (на L) 0,25 г NH₄Cl, 0,1 г KCl, 0,2 г KН₂PO₄, 0,2 г MgSO₄·7H₂O, 0,02 г CaCl₂·2H₂O, 1 г дрожжевого экстракта, 0,5 мл 2 г/л ресазурина, 20 г 2-(N-морфолино) этансульфоновой кислоты (MES), 0,05 г Fe(SO₄)₂·7H₂O, 0,25 г ацетата натрия 3H₂O, 0,05 г нитрилотриуксусной кислоты (NTA) и 10 г фруктозы (только для гетеротрофного роста), 10 мл раствора следовых элементов (TSE) и 10 мл раствора витаминов Вулфа. Состав раствора TSE (на 1 л) был: 2 г NTA, 1 г MnSO₄·H₂O, 0,8 г Fe(SO₄)₂(NH₄)₂·6H₂O, 0,2 г CoCl₂·6H₂O, 0,2 мг ZnSO₄·7H₂O, 0,02 г CuCl₂·2H₂O, 0,02 г NaMoO₄·2H₂O, 0,02 г Na₂SeO₃, 0,02 г NiCl₂·6H₂O и 0,02 г Na₂WO₄·2H₂O. Состав раствора витаминов (на 1 л) был: 2 мг биотина, 2 мг фолиевой кислоты, 10 мг пиридоксина гидрохлорида, 5 мг тиамин HCl, 5 мг рибофлавина, 5 мг никотиновой кислоты, 5 мг пантотената кальция, 0,1 мг витамина В₁₂, 5 мг p-аминобензойной кислоты и 5 мг тиоктовой кислоты. Среду подготавливали анаэробно, и pH среды доводили до 5,8 перед стерилизацией. Перед инокуляцией 100 мл среды CaGM восстанавливали 1 мл восстанавливающего агента 1 (4 г цистеина HCl на 100 мл воды) и 1 мл восстанавливающего агента 2 (7,64 г NTA, 5,33 г Na₂CO₃ и 8,5 мл TiCl₃ на 100 мл воды).

Рост клеток на жидкой среде контролировали спектрофотометрически при 600 нм (OD600). Изменения давления в незаполненном объеме измерялись с использованием прочного цифрового манометра DPG120 (Omega Engineering). Для роста *C. autoethanogenum* на чашках агара использовалась твердая среда YTF (10 г/л фруктозы, 10 г/л дрожжевого экстракта, 16 г/л триптона, 0,2 г/л хлорида натрия, 15 г/л бактериологического агара (оксида) pH 5,8), с использованием антибиотиков (7,5 мкг/мл тиамфеникола, 6 мкг/мл кларитромицина), где это было необходимо. Все работы по мутагенезу выполнялись внутри анаэробной рабочей станции при 37°C (Don Whitley Scientific Ltd). Для сопоставления штаммов от 3 до 4 биологических репликатов (повторов), содержащих *C. autoethanogenum* дикого типа (ДТ) или рекомбинантные штаммы, выращивали в 250 мл сывороточных бутылках, содержащих 50 мл CaGM-среды, с 10 г/л фруктозы, 200 кПа СО или 150 кПа Н₂+50 кПа СО₂ в качестве субстрата для роста. Инкубацию при 37°C проводили с перемешиванием (225 об/мин) внутри шейкеров New Brunswick Innova (Eppendorf). В качестве инокулята использовали стандартизованный 0,5 OD600 эквивалент экспоненциально растущих культур.

1.2. Манипуляции с ДНК.

Манипуляции с ДНК и клонирование проводились в соответствии со стандартными методами в соответствии с Sambrook (Sambrook, Molecular Cloning: The Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001). Геномную ДНК из *C. autoethanogenum* выделяли с использованием набора DNeasy Blood and Tissue (Qiagen) для ПЦР диагностики. Для Саузерн блот анализа геномную ДНК *C. autoethanogenum* экстрагировали в соответствии с Bertram и Dürre (Bertram, Arch. Microbiol., 151:551-557, 1989). Плазмидную ДНК из *C. autoethanogenum* выделяли с использованием набора QIAprep Spin Miniprep (Qiagen) с добавлением 20 мг/мл лизоцима курицы в буфер для лизиса и инкубации при 37°C в течение 30 мин, прежде чем приступить к последующим процедурам. Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили с использованием ДНК-полимеразы Phusion (NEB) или ДНК-полимеразы Q5 (NEB). Праймеры, используемые в этом примере, перечислены в табл. 3. Праймеры были разработаны с использованием Geneious (Biomatters) и синтезированы Sigma-Aldrich или Eurofins. Сиквенирование по Сэнжеру плазмид и ампликонов осуществлялось Source Bioscience Plc (Ноттингем, Великобритания).

Таблица 3

Название праймера	Функция (и)
Univ-0027-F	Амплификация и сиквенирование рРНК 16s для Eubacteria; (2)
Univ-1492-R	
P _{acsA} -NotI-F	Амплификация и клонирование промоторной области <i>acsA</i> (CAETHG_1621) <i>C. autoethanogenum</i>
P _{acsA} -NdeI-R	
aor1-NdeI-F	SOE ПЦР для мутации двух внутренних сайтов рестрикции NdeI и клонирования <i>aor1</i> (CAETHG_0092) из <i>C. autoethanogenum</i>
aor1-SOE-B1	
aor1-SOE-C1	
aor1-SOE-C2B	
aor1-SOE-B2B	
aor1-KpnI-R,	
adhE1a-115S-F	ПЦР-скрининг для интеграции интрона I в вышерасположенный Ald-домен <i>adhE1</i> <i>C. autoethanogenum</i>
adhE1a-115S-R,	

adhE1b-541s-F	ПЦР-скрининг для интеграции интрона I в нижерасположенный Adh-домен <i>adhE1</i> <i>C. autoethanogenum</i>
adhE1b-541s-R	
adhE2-662s-F	ПЦР-скрининг для интеграции интрона I в <i>adhE2</i> <i>C. autoethanogenum</i>
adhE2-662s-R	
aor1-361s-F	ПЦР-скрининг для интеграции интрона I в <i>aor1</i> <i>C. autethanogenum</i>
aor1-361s-R	
aor2-370s-F	ПЦР-скрининг для интеграции интрона I в <i>aor2</i> <i>C. autoethanogenum</i>
aor2-370s-R,	
adhE1-IFD-F	Скрининг двойного кроссовера и последующее сиквенирование <i>adhE1</i> <i>C. autoethanogenum</i>
adhE1-IFD-R	
adhE1-seq-F	Скрининг двойного кроссовера и последующее сиквенирование для делеции в рамке считывания <i>adhE1</i> и <i>adhE2</i> <i>C. autoethanogenum</i>
adhE2-seq-R	
aor2-seq-F	Скрининг двойного кроссовера и последующее сиквенирование делеции в рамке считывания <i>aor2</i> <i>C. autoethanogenum</i>
aor2-seq-R	
ACE-плазмида-F	Связываются в области перед левым гомологичным плечом (LHA) плазмиды ACE. Используется для скрининга одиночного кроссоверного мутанта в LHA
ACE-плазмида-R	Связываются в области перед правым гомологичным плечом (RHA) плазмиды ACE. Используется для скрининга одиночного кроссоверного мутанта в RHA
adhE1-ald-LHA-SacII-F	SOE-ПЦР для построения левого гомологичного плеча для делеции в рамке считывания <i>adhE1</i> или <i>adhE1</i> & 2 <i>C. autoethanogenum</i>
adhE1-IFD-LHA-R	SOE-ПЦР для конструирования гомологичных плечей для делеции в рамке считывания <i>adhE1</i> <i>C. autoethanogenum</i>
adhE1-IFD-RHA-F	
adhE1-IFD-RHA-Ascl-R	
adhE1&2-SOE-B	SOE-ПЦР для конструирования гомологичных плечей для делеции в рамке считывания <i>adhE1</i> & 2 <i>C. autoethanogenum</i>
adhE1&2-SOE-C	
adhE1&2-RHA-Ascl-R	
aor2-LHA-SacII-F	SOE-ПЦР для конструирования гомологичных плечей для делеции в рамке считывания <i>aor2</i> <i>C. autoethanogenum</i>
aor2-LHA-R,	
aor2-RHA-F	
aor2-RHA-Ascl-R	

1.3. Плазмидные векторы и кассеты для аллельного обмена.

Все плазмиды, используемые в этом примере (табл. 4), получены из серии pMTL80000 модульных, челночных векторов *E.coli-Clostridium* (Heap, J. Microbiol. Meth., 78:79-85, 2009).

Таблица 4

Плазмида	Описание
pMTL83151	<i>Escherichia coli/Clostridium</i> модульный челночный вектор, pCB102, ColE1+tra, Cm ^R /Tm ^R
pMTL83151-P _{acsA}	Сверхэкспрессирующая плазмида с промотором <i>acsA</i> (CAETHG_1621) <i>C. autoethanogenum</i> , клонированным между сайтами NotI и NdeI
pMTL83151-P _{acsA} - <i>aor1</i>	Сверхэкспрессирующая плазмида <i>aor1</i> <i>C. autoethanogenum</i>
pMTL84151	<i>E. coli/Clostridium</i> модульный челночный вектор, pCD6, ColE1+tra, Cm ^R /Tm ^R
pMTL-AMH101	ACE для создания штамма с делецией в рамке считывания <i>ΔpyrE</i> (CAETHG_1476) в <i>C. autoethanogenum</i> . Плазмида содержит функциональный <i>pyrE</i> (CAC_0027) <i>C. acetobutylicum</i> в качестве противоселективного (counter selectable) маркера
pMTL-AMH102	Плазмида ACE для восстановления штамма с делецией в рамке считывания <i>ΔpyrE</i> (CAETHG_1476) в <i>C. autoethanogenum</i>
pMTL84151- <i>ΔadhE1</i>	Плазмида ACE для создания делеции в рамке считывания <i>adhE1</i> в <i>C. autoethanogenum</i> . Плазмида содержит функциональный <i>pyrE</i> <i>C. acetobutylicum</i> в качестве противоселективного маркера
pMTL84151- <i>ΔadhE1+2</i>	Плазмида ACE для создания делеции в рамке считывания <i>adhE1</i> и <i>adhE2</i> в <i>C. autoethanogenum</i> . Плазмида содержит функциональный <i>pyrE</i> <i>C. acetobutylicum</i> в качестве противоселективного маркера
pMTL84151- <i>Δaor2</i>	Плазмида ACE для создания делеции в рамке считывания <i>aor2</i> (CAETHG_0102) в <i>C. autoethanogenum</i> . Плазмида содержит функциональный <i>pyrE</i> <i>C. acetobutylicum</i>
pMTL007C-E2	Клостридиальный экспрессионный вектор для ClosTron, содержащий направленный интрон группы II с Erm RAM, фланкированный сайтами FRT, ColE1, pCB102, Cm ^R /Tm ^R
pMTL007C-	Вектор ClosTron, нацеливающий нокаут путем вставки
E2::adhE1a-115s	группы II в локусе <i>adhE1</i> <i>C. autoethanogenum</i> (вышерасположенный Ald-домен CAETHG_3747)
pMTL007C-E2::adhE1b-541s	Вектор ClosTron, нацеливающий нокаут путем вставки группы II в локусе <i>adhE1</i> <i>C. autoethanogenum</i> (нижнерасположенный Adh-домен CAETHG_3747)
pMTL007C-E2::adhE2-662s	Вектор ClosTron, нацеливающий нокаут путем вставки группы II в локусе <i>adhE2</i> <i>C. autoethanogenum</i> (CAETHG_3748)
pMTL007C-E2::aor1-361s	Вектор ClosTron, нацеливающий нокаут путем вставки группы II в локусе <i>aor1</i> <i>C. autoethanogenum</i> (CAETHG_0092)
pMTL007C-E2::aor2-370s	Вектор ClosTron, нацеливающий нокаут путем вставки группы II в локусе <i>aor2</i> <i>C. autoethanogenum</i> (CAETHG_0102)

Мутагенез ClosTron и инструменты для воздействия на интроны, в целом, представляют собой один из наиболее широко используемых клостридиальных мутагенов. Он использует мобильный интрон группы II, который разрушает целевые гены путем вставки (Heap, J. Microbiol. Meth., 80:49-55, 2010; Heap, J. Microbiol. Meth., 70:452-464, 2007). В данном документе показано, что ClosTron может быть успешно

применен к ацетогену и, в частности, к *C. autoethanogenum* через выделение стабильных штаммов КО в генах *adhE1*, *adhE2*, *aor1* и *aor2*.

Для построения плазмиды "pMTL83151-PacsA" промоторную область *acsA* (CAETHG_1621) *C. autoethanogenum* амплифицировали с использованием олигонуклеотидов "PacsA-NotI-F" и "PacsA-NdeI-R" с последующим клонированием в плазмиду pMTL83151 (Hear, J. Microbiol. Meth., 78:79-85, 2009) с использованием сайтов рестрикции NotI и NdeI. Чтобы сконструировать экспрессионную плазмиду *aor1*, "pMTL83151-PacsA-*aor1*", *aor1* подвергали двум раундам сплайс-перекрывающегося удлинения (SOE) (splice-overlapping extension)-ПЦР (Warrens, Gene, 186:29-35, 1997) с использованием праймеров для удаления двух интерферирующих сайтов NdeI перед клонированием с использованием сайтов рестрикции NdeI и KpnI. На обоих интерферирующих сайтах (нуклеотид 975 и 1284) нуклеотиды 'CAT' мутировали в 'CTT', сохраняя при этом одни и те же аминокислоты. Для построения перенацеливающих плазмид ClosTron соответствующие области интронного нацеливания внутри *adhE1*, *adhE2*, *aor1* и *aor2* были сгенерированы *in silico* с вебсайта ClosTron с использованием алгоритма Перутки (Perutka, J. Molec. Biol., 336:421-439, 2004). DNA 2.0 Inc. затем синтезировала область нацеливания интрона 344 п.о. и клонировала ее в вектор ClosTron pMTL007C-E2 (Hear, J. Microbiol. Meth., 80:49-55, 2010) с использованием сайтов рестрикции HindIII и BsrGI, в результате чего получали плазмиду "pMTL007C-E2::*adhE1a_115s*" (нацеливание на вышерасположенный Ald-домен *adhE1*), "pMTL007C-E2::*adhE1b_541s*" (нацеливание на нижерасположенный Adh-домен *adhE1*), "pMTL007C-E2::*adhE2_662s*", "pMTL007C-E2::*aor1_361s*" и "pMTL007C-E2::*aor2_370s*".

Плазмиду аллельного обмена использовали для делеции 227 пар оснований С-конца *rugE* (CAETHG_1476) *C. autoethanogenum* и называли "pMTL-AMH101". Вкратце она содержит гетерологичный *rugE* (*cas_0027*) из *C. acetobutylicum* ATCC 824 (для использования в качестве протво-селективного маркера) и содержит короткое гомологичное плечо (SHA) 303 п.о. и большое гомологичное плечо (GHA) 1219 п.н. с *lacZα* между ними в качестве кассеты аллельного обмена. Кассеты аллельного обмена для делеций в рамке считывания (IFD) *adhE1*, *adhE1+2* и *aor2* *C. autoethanogenum* состоят из двух гомологичных плечей сходной длины (518-580 п.о.) и собираются с использованием SOE-ПЦР и олигонуклеотидов. На всех кассетах IFD сохранялись только старт- и стоп-кодона целевых локусов, не затрагивая 5'-нетранслируемую область (UTR) и 3'-UTR. После SOE-ПЦР кассеты IFD расщепляли SacII и AscI и клонировали в плазмиду pMTL-AMH101 для получения плазмид "pMTL84151-Δ*adhE1*", "pMTL84151-Δ*adhE1+2*" и "pMTL84151-Δ*aor2*". Для восстановления *rugE* использовали плазмиду, называемую pMTL-AMH102, которая состоит из восстановительной кассеты аллельного обмена *rugE* с SHA 526 п.о. и GHA 1213 п.о.

1.4. Перенос плазмиды в *C. autoethanogenum*.

Плазмиды трансформировали в донорный штамм CA434 *E.coli* (HB101, содержащий конъюгативную плазмиду R702), а затем переносили в *C. autoethanogenum* посредством конъюгации с использованием ранее разработанных методов (Mock, J. Bacteriol., 197:2965-2980, 2015; Purdy, Molec. Microbiol., 46:439-452, 2002; Williams, J. Gen. Microbiol., 136:819-826, 1990). Тиамфеникол (7,5 мкг/мл) использовали для отбора плазмид на основе *catP*. Триметоприм (10 мкг/мл) использовали для противоселекции против *E.coli* CA434 после конъюгации. Для валидации штаммов плазмидной комплементации, плазмиды выделяли из трансконъюгантов *C. autoethanogenum* и затем трансформировали в клетки *E.coli*, перед тем как проводили рестрикционный анализ "спасенных" плазмид. Ген рПНК 16s также амплифицировали из геномной ДНК трансконъюгантов с использованием 'univ-0027-F' и 'univ-1492-R' олигонуклеотидов, а затем сиквенировали по Сэнжеру с целью проверки.

1.5. Конструирование штаммов ClosTron *C. autoethanogenum*.

После конъюгации перенацеливающих ClosTron плазмид в *C. autoethanogenum* колонии, устойчивые к тиамфениколу и триметоприму, переносили на твердую среду YTF, дополненную 6 мкг/мл кларитромицином, для селекции вставки Интрона в целевые локусы, и многократно высевали на одну и ту же селективную среду до тех пор, пока потеря плазмиды не проявлялась, что было очевидным из потери способности расти на среде, дополненной тиамфениколом. Геномную ДНК экстрагировали из колоний, устойчивых к кларитромицину, и подвергали ПЦР-скринингу с использованием локус-специфических фланкирующих праймеров для идентификации клонов, которые продуцировали ампликон, который на 1,8 т.п.о. больше, чем контроль ДТ (что свидетельствовало о вставке ClosTron в указанный локус ДНК) (фиг. 2 и 3). Сиквенирование по Сэнжеру ампликонов ClosTron было выполнено для проверки местоположения вставки ClosTron. В качестве окончательной проверки Саузерн блот анализ проводили с использованием набора на основе дигоксигенина (DIG) для мечения и детекции ДНК High-Prime (Roche) в соответствии с инструкцией изготовителя, чтобы удостовериться, что в каждом мутанте произошла только одна вставка ClosTron (фиг. 2 и 3).

1.6. Протокол проведения аллельного обмена.

1.6.1. Создание штамма Δ*rugE*.

Мутагенез ClosTron является быстрым и воспроизводимым, но имеет некоторые ограничения. В первую очередь, интронная вставка может иметь полярные эффекты на нижерасположенные гены. В

данной заявке был разработан и описан способ аллельного обмена для *C. autoethanogenum*, способный продуцировать IFD, на основе использования псевдо-суицидального вектора и закодированного в плазмиде маркера против-селекции, состоящего из гена оротат фосфорибозилтрансферазы (*pyrE*) *Clostridium acetobutylicum*. Это эквивалентный подход к тому, который принят для *Clostridium difficile* (Ng, Expanding the repertoire of gene tools for precise manipulation of the *Clostridium difficile* genome, PLOS One, 8, 2013) и *C. acetobutylicum* (Ehsaan, Biotechnol. Biofuels., 9:1-20, 2016), где единый кроссовер, хромосомные интегранты псевдосуицидальной нокаутной плазмиды обнаруживаются по более быстрому росту (более крупные колонии) на средах, дополненных тиамфениколом. Псевдосуицидные плазмиды построены на основе репликационно-дефектных плазмид (в данном случае репликаона плазмиды pMTL84151), которые, следовательно, плохо разделяются между дочерними клетками, что ограничивает рост популяции клеток в присутствии антибиотика. Таким образом, единичные кроссоверные интегранты имеют преимущество роста и могут быть использованы для селекции двухкроссоверные производные вырезания плазмиды путем высеваания на против-селекционный агент, 5-фтороротовую кислоту (FOA). Последний метаболизируется в высокоотоксичное соединение 5-фторурацил (FU) посредством действия фермента *PyrE*, кодируемого плазмидой. Только те клетки, которые теряют ген *pyrE* после удаления плазмиды, могут выжить. Явления вырезания приводят к клеткам, несущим либо исходный аллель ДТ, либо желаемый мутантный IFD-аллель. Эти две популяции можно различить с помощью соответствующего ПЦР-скрининга.

Для того чтобы *pyrE* использовался в качестве против-селективного маркера, хозяин должен быть *pyrE*-негативным штаммом. Такие хозяева относительно легко изготавливаются с использованием метода спаренной с аллелем замены (Allele-Coupled Exchange - ACE) (Heap, Nucleic. Acids. Res., 40:e59, 2012). Соответственно, был получен вектор ACE, эквивалентный pMTL-YN18 (Ng, Expanding the repertoire of gene tools for precise manipulation of the *Clostridium difficile* genome, PLOS One, 8, 2013) и использован для генерации производного от *C. autoethanogenum*, не имеющего 3'-конца (227 п.о.) нативного гена *pyrE* (CAETHG_1476). Ген *aor1* был сначала инактивирован с использованием мутагенеза Clostron в этом штамме *DrugE* до того, как была проведена IFD *aor2* путем аллельного обмена с использованием КО вектора на основе *pyrE* (pMTL84151-*Doar2*) и против-селекции с использованием FOA. После создания *aor1+2* КО штамма мутантный *pyrE*-аллель восстанавливали до ДТ (прототрофия по урацилу) с использованием специально сконструированного вектора коррекции ACE, аналогичного pMTL-YN1 *C. difficile* (Ng, Expanding the repertoire of gene tools for precise manipulation of the *Clostridium difficile* genome, PLOS One, 8, 2013).

Принятая процедура была такой же, как описано ранее (Heap, Nucleic. Acids. Res., 40:e59, 2012). Для конструирования штамма *DrugE*, который служит в качестве хозяина для дальнейшей IFD *adhE1*, *adhE1+2* и *aor2* с использованием *pyrE* в качестве позитивного и отрицательного селекционного маркера, плазмиду pMTL84151-*DrugE* трансформировали в *C. autoethanogenum* посредством конъюгации. Трансконъюганты пересивали на твердую среду YTF, дополненную тиамфениколом и триметопримом, для обогащения и идентификации быстрорастущих односегментных клонов интегрантов. Геномную ДНК выделяли и подвергали ПЦР-анализу с использованием двух различных праймеров (ACE-плазида-F и ACE-плазида-R), которые связываются с специфическими последовательностями плазмиды вместе с соответствующими локус-специфическими фланкирующими праймерами. Присутствие фрагмента ДНК указывает на то, что клоны действительно являются однокроссоверными интегрантами, в то время как размер указывал на то, в каком плече гомологии произошло рекомбинационное явление. ПЦР-верифицированные одно-кроссоверные интегранты были инокулированы в жидкую среду CaGM, дополненную 10 г/л фруктозой и тиамфениколом, и они выращивались в течение 2 суток внутри анаэробной рабочей станции до того, как они были последовательно разбавлены и посеяны. Для облегчения скрининга редких событий второй рекомбинации в твердая среда CaGM меняли 1 г/л дрожжевого экстракта на 1 г/л гидролизата казеиновой кислоты, и дополняли 1,5 мг/мл фтороротовой кислоты (FOA) и 5 мкг/мл урацила. Инкубацию при 37°C проводили внутри анаэробной рабочей станции, а FOA-резистентные колонии, которые возникали в течение 2-3 суток, пересевались на ту же селективную среду до того, как был осуществлялся ПЦР-скрининг с использованием локус-специфических фланкирующих праймеров, чтобы отличить двойные кроссоверные рекомбинантные клоны от ревертантных клонов дикого типа. Сиквенирование по Сэнжеру использовалось для подтверждения ожидаемых генотипов (фиг. 4).

1.6.2. Создание штаммов $\Delta adhE1$, $\Delta adhE1mut$ и $\Delta adhE1+2$.

Чтобы исследовать последствия делеции обоих доменов *adhE1*, а также *adhE1+adhE2*, подходящие мутанты делеции в рамке считывания *C. autoethanogenum* были спланированы с использованием *pyrE*-направленного аллельного обмена. В первой попытке создания штамма $\Delta adhE1$ был получен штамм $\Delta adhE1mut$. ПЦР-скрининг и сиквенирование по Сэнжеру этого штамма показали, что *adhE1* *C. autoethanogenum* был удален, а также непреднамеренную делецию 84 п.о. в промоторной области *adhE2* (фиг. 5). Исследование этой промоторной области в последовательности ДТ выявило наличие двух повторов 9 п.о., фланкирующих делецию 84 п.о. (фиг. 5). Последовательность 84 п.о. содержит предполагаемый

терминатор и бокс -10 и -35 промотора adhE2. Вторая попытка создания "чистого" IFD-штамма adhE1 без непреднамеренной делеции 84 п.о. была успешной и дала штамм Δ adhE1 (фиг. 5). Однако этот штамм постоянно удерживал плазмиды, используемые для генерации IFD, несмотря на неоднократные попытки избавиться от этих плазмид. Создание штамма adhE1 и adhE2 с двойной IFD, Δ adhE1+2, было подтверждено ПЦР-скринингом (фиг. 5) и секвенированием по Сэнжеру, которое показало, что оба гена были успешно удалены без осложнений в 5'-UTR adhE1 и 3'-UTR adhE2. После IFD не было получено никаких чувствительных к тиамфениколу клонов штамма Δ adhE1+2. Штаммы Δ adhE1 и Δ adhE1+2 не были дополнительно охарактеризованы из-за удерживания плазмид, используемых для генерации IFD-штаммов, что сделало их генетически неустойчивыми.

После того как потеря плазмиды была проявлена потерей устойчивости к тиамфениколу, штамм DruGE мог служить хозяином для реципиента плазмид pMTL84151- Δ adhE1 и pMTL84151- Δ adhE1+2 через конъюгацию для построения штаммов Δ adhE1 и Δ adhE1+2 соответственно. Для обеих мишеней были получены одно-кроссоверные интегранты и дву-кроссоверные FOA-устойчивые, ауксотрофные по урацилу клоны (тот же метод, что и для штамма DruGE выше). В первой попытке секвенирование по Сэнжеру обнаружило, что в дополнение к IFD adhE1 в промоторной области adhE2 произошла непреднамеренная делеция 84 п.о. У этого штамма, названного " Δ adhE1mut", также была подтверждена потеря плазмиды потерей устойчивости к тиамфениколу. Вторая попытка создания "чистого" " Δ adhE1" штамма без непреднамеренного удаления 84 п.о. была успешной, но повторные попытки избавиться от плазмиды (которая проявлялась стойкой устойчивостью к тиамфениколу) оказались безуспешными. Для штамма Δ adhE1+2 секвенирование по Сэнжеру выявило успешную делецию adhE1 и adhE2 без осложнений в 5'-UTR adhE1 и 3'-UTR adhE2. Тем не менее повторное высевание не смогло изолировать чувствительные к тиамфениколу колонии для этого штамма.

1.6.3. Создание штамма двойного КО aor1+2.

Для построения штамма двойного нокаута aor1+2 (в данном документе называемого "aor1+2 КО") locus aor1 был сначала инактивирован с использованием плазмиды Clostron pMTL007C-E2::aor1_361s в штамме DruGE. После потери плазмиды, плазмиду IFD pMTL84151- Δ aor2 трансформировали и выделение однокроссоверных интегрантов и двухкроссоверных рекомбинантных клонов проводили, как описано выше. Эти aor1 и aor2 двойные КО ауксотрофные по урацилу трансформировали плазмидой pMTL-AMN102 для восстановления прототрофии по урацилу. Быстрорастущие колонии, устойчивые к тиамфениколу, высевали на твердую среду CaGM, дополненную 10 г/л фруктозы, но при этом 1 г/л дрожжевого экстракта заменяли 1 г/л гидролизата казеиновой кислоты без добавления урацила. В качестве окончательной валидации ПЦР-скрининг с последующим секвенированием по Сэнжеру проводили с использованием фланкирующих праймеров для проверки явления вставки Clostron в aor1, IFD aor2 и восстановления rufE. Также была продемонстрирована потеря плазмид в форме чувствительности к тиамфениколу.

1.7. Сбор клеток для анализа экспрессии генов.

Рекомбинантные штаммы *S. autoethanogenum* культивировали в трипликатах в 500 мл лабораторных флаконах (pressure plus - Duran), каждый из которых содержал 200 мл CaGM, дополненную 10 г/л фруктозы. Для штаммов DruGE и Δ adhE1mut добавляли 10 мкг/мл урацила. Для сохранения плазмид в *S. autoethanogenum*, несущих плазмиды pMTL83151-PacsA и pMTL83151-PacsA-aor1, добавляли 7,5 мкг/мл тиамфеникола. Количество клеток результирующее в приблизительном OD600 12 собирали на различных фазах роста путем центрифугирования при 4°C при 3220×g в течение 10 мин. Супернатант удаляли и осадок клеток ресуспендировали в 1 мл раствора стабилизации RNeasy (Qiagen) путем пипетирования. После инкубации в течение ночи при 4°C суспензию клеток центрифугировали при 3220×g при 4°C в течение 10 мин и супернатант удаляли перед хранением при -80°C до экстракции РНК.

1.8. Экстракция тотальной РНК и синтез кДНК.

После добавления 1,5 мл холодного TRIzol (Ambion), оттаявший клеточный осадок переносили в предварительно охлажденные 2 мл микроцентрифужные пробирки, содержащие 1 г dnature гранул циркония/силиката диаметром 0,1 мм (dnature Ltd). Разрушение клеток выполнялось в 3 цикла с 1-минутным биением гранулами с использованием Mini Beadbeater-16 (dnature Ltd), с 1 мин охлаждения на льду между циклами. После 1 мин центрифугирования при 4°C при 20238×g супернатант собирали и добавляли 100 мкл хлороформа, перемешивали на вортексе в течение 20 с и затем инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин, перемешивая время от времени. После центрифугирования при 20238×g (4°C) в течение 15 мин водную фазу собирали и добавляли 0,7 объема изопропанола. Образцы инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин перед центрифугированием при 20238×g (4°C) в течение 10 мин. Супернатант удаляли и осадок ДНК промывали 700 мкл ледяного 70% (об./об.) этанола перед другим циклом центрифугирования 20238×g (4°C) в течение 10 мин. После удаления надосадочной жидкости осадок РНК сушили на воздухе в течение 15 минут перед повторным суспендированием в 100 мкл воды без РНКазы и 1 мкл RNaseOUT (Invitrogen).

Геномную ДНК удаляли добавлением фермента TURBO DNase (Ambion) и инкубированием при 37°C в течение 30 мин. Обработанную ДНКазой РНК очищали с использованием набора для очистки и концентрирования РНК (RNA Clean and Concentrator kit - Zymo Research) в соответствии с инст-

рукциями производителя и хранили при -80°C . Концентрацию и чистоту выделенной РНК анализировали спектрофотометрически с использованием Nanodrop (Thermo Scientific). Для обеспечения отсутствия остаточной геномной ДНК в изолированной РНК 1 мкл каждого образца РНК подвергали ПЦР-анализу с использованием праймерных пар "adhE2-662s-F" и "adhE2-662s-R". Качество РНК было исследовано с использованием 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) и образцы РНК с числом целостности РНК (RIN), превышающим 7, использовались для синтеза кДНК. 2 мкг тотальной РНК использовалось на 20 мкл реакции с обратной транскриптазой Superscript III (Invitrogen) и разбавляли в 10 раз водой без РНКазы перед анализом кПЦР.

1.9. Количественная полимеразная цепная реакция после обратной транскриптазы (кОТ-ПЦР).

Праймеры и наборы зондов для гена-мишени (adhE2) и контрольных генов (gyrA и rho) (табл. 5) были разработаны с использованием инструмента для разработки произвольного TaqMan теста (Custom TaqMan Assay Design Tool) и были приобретены как произвольные тесты экспрессии генов TaqMan в одной пробирке (Single-Tube Custom TaqMan Gene Expression Assays) у Applied Biosystems. gyrA (CAETHG_2130; кодирует субъединицу А ДНК гиразы) и rho (CAETHG_2327; кодирует фактор терминации транскрипции) были выбраны в качестве контрольных генов, потому что они проявляли наиболее стабильные уровни экспрессии в разных источниках углерода и при разных стрессах в близкородственном ацетогене *C. ljungdahlii* DSM 13528 (Liu, J. Biosci. Bioeng., 116:460-464, 2013). Эффективности амплификации зондов и праймеров TaqMan были эмпирически определены на уровне от 94,2 до 99,7% ($R^2 \geq 0,998$) путем построения стандартной кривой с использованием последовательно разведенной кДНК в качестве матрицы (данные не показаны).

Таблица 5

Тест ID	Название Теста
A189K 3D	<i>gyrA</i>
A1AAZ 86	<i>rho</i>
A111NG Q	<i>adhE2</i>

Все реакции кОТ-ПЦР были приготовлены в 96-луночных планшетах Microseal PCR (Bio-Rad Laboratories) и выполнялись в трипликатах в объеме 20 мкл, содержащем 1 мкл разбавленной кДНК, 1 мкл 20× смеси произвольного теста экспрессии генов TaqMan, 10 мкл 2× мастермикса для экспрессии генов TaqMan (Applied Biosystems) и 8 мкл воды без нуклеаз. Для каждого мастермикса кОТ-ПЦР пробы и праймера TaqMan были использованы отличные от образца контроля (NTC - non-template controls). Каждый цикл кОТ-ПЦР включал начальную денатурацию и активацию полимеразы при 95°C в течение 12 мин, а затем 40 циклов денатурации при 95°C в течение 15 с и комбинированный отжиг и удлинение при 60°C в течение 60 с. Система детекции с помощью ПЦР в реальном времени CFX connect (Bio-Rad Laboratories) использовалась для регистрации накопления сигналов в каждой лунке в ПЦР-плашке, а прилагаемое программное обеспечение CFX Manager использовалось для выполнения нормализованного анализа экспрессии генов.

1.10. Аналитическая химия.

Анализ метаболитов проводили с использованием системы HPLC Varian ProStar, оборудованной RID (детектором показателя преломления - Refractive Index Detector), работающим при 30°C , и колонкой Aminex HPLX-87H (1300×7,8 мм, размер частиц 9 мкм) (Bio-Rad Laboratories), которую использовали при 30°C . Использовали слегка подкисленную воду (0,005 М H_2SO_4) в качестве подвижной фазы со скоростью потока 0,5 мл/мин. Для удаления белков и других остатков клеток образцы центрифугировали при 20238×g в течение 5 мин и супернатант фильтровали с помощью фильтров Spartan 13/0.2 RC. 10 мкл супернатанта затем вводили в ВЭЖХ для анализа.

1.11. Анализ данных и презентации.

Статистический анализ и графически представленные результаты были получены с использованием GraphPad Prism. Для сравнения средних использовались двухсторонние, непарные, параметрические t-тесты Стьюдента.

1.12. Метаболическая инженерия непрямого пути синтеза этанола.

Стехиометрический и термодинамический анализ для ацетогенов, таких как *C. autoethanogenum*, предсказал, что в условиях аутоτροφного роста АТФ является ограничивающим фактором, и очень мало этанола может быть образовано без начальной стадии образования АТФ, формирования ацетата и затем превращения в ацетальдегид посредством действия AOR (Fast and Papoutsakis, 2012; Mock et al., 2015). Восстановленный ферредоксин, необходимый для активности AOR, может быть образован при окислении CO (дегидрогеназой монооксида углерода) или H_2 (NADP-зависимой бифурцирующей электроны

[FeFe]-гидрогеназой (Wang et al., 2013)). Геном *C. autoethanogenum* кодирует две изоформы *aog*: *aog1* (CAETHG_0092) и *aog2* (CAETHG_0102).

Автотрофный рост мутантов *aog* с мутацией в одном гене: рост в бутылке для сыворотки штамма *aog1* КО на СО характеризовался расширенной лаг-фазой (10 суток), что в конечном итоге приводило к плотности клеток, которая была в два раза меньше плотности ДТ (значение $p < 0,0001$) (фиг. 6). Концентрация ацетата, продуцируемого штаммом, была, однако, аналогична концентрации ДТ. Напротив, штамм *aog1* КО продуцировал только 43% этанола (значение $p = 0,019$) и 23% 2,3-бутандиола (значение $p < 0,0001$) (фиг. 6) относительно ДТ. Штамм *aog1* КО синтезировал 2,6 мМ лактата, что было в 11 раз выше, чем уровень в ДТ (значение $p = 0,001$) (фиг. 6). Что касается скорости роста и плотности клеток, то штамм *aog2* КО вел себя очень сходно с штаммом *aog1* КО, хотя в этом случае лаг-фаза была увеличена до 25 суток (фиг. 6). Однако по отношению к ДТ штамм *aog2* генерировал на 170% больше этанола (значение $p = 0,009$), на 36% меньше ацетата (значение $p = 0,0001$) и аналогичные уровни 2,3-бутандиола и лактата (фиг. 6).

В попытке комплементировать штамм *aog1* КО плазмиду pMTL83151-PacA-*aog1* трансформировали в этот штамм (фиг. 7). Что касается лаг-фазы, то комплементированный штамм вел себя как ДТ. Указанная культура достигла конечной плотности клеток 1,28 при OD600 по сравнению с 0,85, достигнутой штаммом *aog1* КО (значение $p = 0,010$) (фиг. 8). Напротив, уровни продукции этанола и лактата были восстановлены до уровней ДТ в комплементированном штамме (фиг. 8).

Гетеротрофный рост мутантов *aog* с мутацией в одном гене.

Для оценки влияния инактивации *aog* на гетеротрофный рост штаммы *aog1* КО и *aog2* КО вместе с ДТ выращивали на фруктозе в качестве источника углерода. Как изображено на фиг. 9, оба штамма АО КО достигли аналогичной плотности клеток, эквивалентной ДТ. По сравнению с ДТ штамм *aog1* КО генерировал на 21% больше ацетата (статистически не значимо), на 33% меньше этанола (значение $p = 0,014$) и на 61% меньше 2,3-бутандиола (значение $p = 0,018$) (фиг. 9). Напротив, штамм *aog2* КО синтезировал количество ацетата и 2,3-бутандиола, которое было похоже на количество в ДТ, но на 47% больше этанола (значение $p = 0,003$) (фиг. 9).

Результаты ВЭЖХ показали, что все три штамма полностью исчерпали предоставленную фруктозу и лактат не продуцировался (данные не показаны).

Различная роль двух изозимов AOR.

Два изофермента AOR имеют одинаковую длину и имеют идентичность 78%, но данные транскриптомов показывают, что *aog1* экспрессирован на уровнях в 5-10×, более высоких, чем *aog2*, во время роста на СО (Mock et al., 2015), и оба гена *aog* экспрессируются на более высоких уровнях при автотрофном росте по сравнению с гетеротрофным ростом. В соответствии с данными экспрессии было установлено, что

(i) инактивация экспрессированного на повышенном уровне *aog1* в *C. autoethanogenum* оказывает ослабляющее влияние на рост и образование этанола и 2,3-бутандиола в присутствии СО; и

(ii) рост штамма *aog1* КО существенно не менялся на фруктозе в качестве источника углерода, но продуцирование этанола было значительно снижено.

Напротив, инактивация *aog2* стойко увеличивала продуцирование этанола во время роста на СО или фруктозе. Одним из возможных объяснений контрастного фенотипа является то, что AOR2 функционирует преимущественно при окислении ацетальдегида, тогда как AOR1 функционирует преимущественно в восстановлении уксусной кислоты. Альтернативно инактивация *aog2* может снизить конкуренцию за доступ к субстрату в высоко экспрессированном и предположительно более эффективном AOR1, что приводит к увеличению продуцирования этанола. Эти результаты в совокупности свидетельствуют о контрастной роли *aog1* по сравнению с *aog2* в продуцировании этанола в *C. autoethanogenum*.

Оба штамма *aog1* КО и *aog2* КО демонстрировали пролонгированную лаг-фазу роста и уменьшали конечную плотность клеток при выращивании на СО, что указывало на неполноценность в переработке восстановленных ферредоксинов, образующихся при окислении СО. Альтернативным вариантом для удаления восстановленного ферредоксина является реакция с участием пируват:ферредоксин оксидоредуктазы (ПФОР), которая превращает ацетил-СоА и СО₂ в пируват, что может впоследствии изменить продуцирование продуктов, полученных из пирувата, таких как 2,3-бутандиол и лактат (фиг. 1). 11-кратное увеличение уровня продуцирования лактата штаммом *aog1* КО (но не штаммом *aog2* КО) относительно ДТ показало, что продуцирование лактата, а не 2,3-бутандиола, является предпочтительным путем достижения редокс баланса при инактивации *aog1*. Генерация лактата из пирувата вовлекает только один фермент (лактатдегидрогеназу), тогда как биосинтез 2,3-бутандиола вовлекает три фермента (ацетоллактатсинтаза, ацетоллактатдекарбоксилаза и 2,3-бутандиолдегидрогеназа) (Körke et al., 2014; Körke et al., 2011) (фиг. 1). Если предпочтительным продуктом является 2,3-бутандиол (ценный стандартный химикат), лактатдегидрогеназа (*ldhA*, CAETHG_1147) (Körke et al., 2014) может быть инактивирована в *aog1*-дефицитном штамме.

Присутствие множества *aog* генов у *C. autoethanogenum* затрудняет интерпретацию фенотипа штамма *aog* КО с одним нокаутированным геном, так как незатронутые гены *aog* могут компенсировать любую

потерю активности, связанную с инактивированным геном. Созданный в этом примере штамм двойного КО aog1+2 представляет собой уникальный штамм, который полностью лишен функционального AOR и должен полагаться на прямое восстановление ацетил-СоА в этанол через ацетальдегид.

Автотрофный рост двойного мутанта AOR: Во время роста на чистом СО штамм aog1+2 двойного КО демонстрировал пролонгированную лаг-фазу, в конечном итоге достигая плотности клеток, которая была на 69% ниже, чем ДТ (значение $p < 0,0001$), и была способна только на уменьшение давления в незаполненном объеме на 101 кПа в течение эксперимента по сравнению с уменьшением на 163 кПа в контроле ДТ (фиг. 6). Этот замедленный рост и низкое потребление газа подчеркивают важную роль AOR в поддержке роста и использовании СО.

Что касается продуцирования метаболитов из СО по отношению к ДТ, штамм двойного КО продуцировал на 46% меньше этанола (значение $p = 0,034$), на 38% меньше ацетата (значение $p < 0,0001$), на 66% меньше 2,3-бутандиола (значение $p < 0,0001$), но в 7,5 раза более высокий уровень лактата (значение $p < 0,0001$) (фиг. 6). Эти результаты показывают, что, хотя титр этанола был уменьшен в половине в результате инактивации AOR, оставшаяся половина этанола все еще может быть синтезирована из СО путем прямого восстановления ацетил-СоА. Следует отметить, что штамм aog1+2 двойного КО не проявлял более сильных уменьшений в отношении роста и образования этанола по сравнению с штаммами aog1 или aog2 одиночными КО. Фенотип штамма двойного КО aog1+2, растущий на СО, наиболее похож на фенотип штамма aog1 одиночного КО, который обеспечил дополнительные доказательства того, что aog1 (а не aog2) является основным ферментом, поддерживающим рост на СО и биосинтез этанола.

На $H_2 + CO_2$ лаг-фаза роста штамма aog1+2 двойного КО незначительно увеличилась, но этот штамм способен был расти до аналогичной плотности клеток, что и ДТ и уменьшал давление незаполненного объема на ту же величину, что и ДТ (фиг. 10). На молярной основе только половина восстановленного ферредоксина образуется из H_2 по сравнению с СО (фиг. 1), что может привести к меньшему редокс дисбалансу и объяснить, почему штамм КО был способен расти без значительных проблем на $H_2 + CO_2$. Продуцирование ацетата не было затронуто, но штамм КО продуцировал в 9,2 раза меньше этанола, чем ДТ (значение $p < 0,0001$) (фиг. 10). Ни лактат, ни 2,3-бутандиол не продуцировался ни одним из штаммов (данные не показаны).

Вывод о том, что в клеточном экстракте *C. autoethanogenum*, который растили на $H_2 + CO_2$, была обнаружена очень высокая удельная активность Aog, которая также была в 4 раза выше, чем в экстракте клеток выращенных на СО, и в 5,3 раза выше, чем экстракте клеток выращенных на фруктозе (Mock et al., 2015), подчеркнул значение Aog в биосинтезе этанола в условиях выращивания на $H_2 + CO_2$. Результаты подтвердили предсказание Fast и Papoutsakis (2012) и Mock et al. (2015), что очень мало этанола может быть получено в условиях ограниченного наличия АТФ при выращивании на $H_2 + CO_2$ без действия Aog. По совпадению, известные продуценты ацетогенных этанолов, такие как *C. ljungdahlii* (Körpke et al., 2010) и *C. carbonivorans* (Bruant et al., 2010), обладают Aog, тогда как у не-этанол продуцирующих ацетогенов, таких как *Acetobacterium woodii* (Poehlein et al., 2012)) отсутствует Aog.

При гетеротрофном росте на фруктозе в условиях наличия АТФ, рост, продуцирование этанола и 2,3-бутандиола штамма двойного КО aog1+2 существенно не менялись (фиг. 9). В *Rugosoccus furiosus* делеция его единственного Aog приводила к минимальному продуцированию этанола при выращивании на мальтозе (Basen et al., 2014).

1.13. Полное разрушение как aog1, так и aog2 упраздняет возможность восстановления карбоновых кислот в спирты.

Было показано, что Aog-несущие ацетогены, такие как *C. ljungdahlii* и *C. ragsdalei*, каталитически восстанавливают диапазон карбоновых кислот, таких как пропионовая кислота, масляная кислота, валериановая и капроновая кислота, превращая их в соответствующие первичные спирты с использованием СО в качестве донора электронов (Isom et al., 2015; Perez et al., 2013). Чтобы исследовать, способен ли Aog в *C. autoethanogenum* катализировать такие реакции, ДТ и штамм двойного КО aog1+2 растили на СО в присутствии добавленных 60 мМ ацетата, 40 мМ пропионата и 40 мМ бутирата.

Добавление 60 мМ ацетата (физиологического метаболита) имело стимулирующий эффект на рост на СО *C. autoethanogenum*, поскольку лаг-фаза была редуцирована с 5 до 1 суток (фиг. 11), но не для штамма КО. До 31,3 мМ ацетата потреблялось ДТ на ранней экспоненциальной фазе, но чистое продуцирование 79,1 мМ ацетата регистрировалось в стационарной фазе (фиг. 11). В стационарной фазе ДТ генерировал до 70,8 мМ этанола (фиг. 11). Напротив, aog-дефицитный штамм не мог потреблять ацетат на любой из стадий роста и продуцировал только 7,2 мМ этанола (фиг. 11). Восстановление уксусной кислоты до альдегида с помощью восстановленного ферредоксина является термодинамически очень неблагоприятным в стандартных условиях ($\Delta G_o' = 35$ кДж/моль) (Thauer et al., 1977) из-за чрезвычайно низкого потенциала реакции ($E_o' = -580$ мВ) Loach, 1976). Однако в физиологических условиях с внутриклеточным рН в 6,0 и при в 1000 раз большей концентрации внутриклеточного ацетата, чем концентрации ацетальдегида, эта реакция является экзергонической (Mock et al., 2015). Расход ацетата с одновременным продуцированием этанола при экспоненциальном росте *C. autoethanogenum* указывает на то, что этот ацетоген легко катализирует восстановление уксусной кислоты с использованием СО в качест-

ве восстановителя.

Подобно добавлению ацетата, добавление нефизиологического субстрата пропионата при культивировании на СО, уменьшало лаг-фазу роста ДТ от 5 до 2 суток (фиг. 12), тогда как лаг-фаза роста штамма *aog1+2* двойного КО была неизменной. Увеличение плотности клеток (OD600) с 0,61 (без добавок) до 1,1 (добавление пропионата) и снижение давления незаполненного объема на тот же уровень, что и у ДТ наблюдалось для штамма двойного КО (фиг. 12). Концентрации пропионата оставались неизменными и 1-пропанол не обнаруживался в культурах штамма двойного КО (фиг. 12). Напротив, в культурах штамма ДТ было потреблено 24,2 мМ пропионата и продуцировано 20,9 мМ 1-пропанола во время экспоненциальной фазы роста (фиг. 12).

В случае добавления бутирата в присутствии СО штамм *aog1+2* двойного КО рос до такого же OD600, как и ДТ, и уменьшал давление незаполненного объема в той же степени (фиг. 13). Штамм КО продуцировал на 17% больше ацетата (значение $p=0,019$), на 36% больше 2,3-бутандиола (статистически не значимо), 2,8 мМ лактата (тогда как ДТ не продуцировал его вообще), но на 44% меньше этанола (значение $p=0,016$), чем ДТ. Неспособность метаболизировать ацетат и пропионат у штамма КО согласовалась с отсутствием потребления добавленного бутирата и отсутствием продуцирования 1-бутанола (фиг. 13). Напротив, в культурах ДТ потреблялось 7,4 мМ бутирата и 6,0 мМ 1-бутанола, который был выработан во время стационарной фазы роста (фиг. 13).

В совокупности эти результаты показали, что *Aog C. autoethanogenum* необходим для восстановления карбоновых кислот в их соответствующие первичные спирты. Для достижения более высокого процента превращения кислоты, незаполненный объем сыровоточных бутылок должен быть регенерирован СО. Очевидный широкий диапазон субстратов *Aog* в *C. autoethanogenum* согласуется с обнаружением того, что кристаллическая структура *Aog* из *P. furiosus* идентифицировала канал, который достаточно велик для размещения ряда субстратов, включая алифатические и ароматические альдегиды (Chan et al., 1995). *Aog* из *C. autoethanogenum* может быть гетерологично экспрессирован в ацетогенах, продуцирующих бутират, таких как *Clostridium drakei* (Gössner et al., 2008), *Clostridium scatologenes* (Küsel et al., 2000), *Eubacterium limosum* (Genthner et al., 1981) и *Oxobacter pfennigii* (Krumholz and Bryant, 1985) для генерации 1-бутанола.

1.14. Инактивация *adhE2* снижает выработку этанола в гетеротрофных условиях.

Как часть растворогенерирующего пути, бифункциональный *AdhE* распространен во многих ферментативных микроорганизмах. *AdhE* обычно состоит из N-концевого ацетилирующего *Ald*-домена, за которым следует C-концевой *Adh*-домен (Extance et al., 2013; Membrillo-Hernandez et al., 2000). Ключевая роль *AdhE* в образовании спирта была продемонстрирована в *C. ljungdahlii* (Banerjee et al., 2014; Leang et al., 2013), *C. acetobutylicum* (Fontaine et al., 2002), *C. thermocellum* (Lo et al., 2015), *E. coli* (Membrillo-Hernandez et al., 2000), *Lactococcus lactis* (Arnau et al., 1998), *Geobacillus thermoglucosidasius* (Extance et al., 2013) и *Thermoanaerobacter ethanolicus* (Peng et al., 2008). Очищенный *AdhE2* из *C. acetobutylicum* и *AdhE* из *T. ethanolicus* показал высокую *Ald*-активность, но низкую *Adh*-активность (Fontaine et al., 2002; Peng et al., 2008), что может объяснить, почему многие ферментативные микроорганизмы обладают множественными генами *adh*. Поскольку делеционные исследования и характеристика отдельных доменов *AdhE* показывают, что *Ald* и *Adh*-домены функционально автономны (Arnau et al., 1998; Chen et al., 2004; Espinosa et al., 2001), *Ald*-домен и *Adh*-домены *adhE1* в *C. autoethanogenum* независимо разрушали с помощью *Clostron*, генерируя штаммы "*adhE1a KO*" и "*adhE1b KO*" соответственно. Д штамм "*adhE2*" КО разрушали только *Ald*-домен.

Рост штаммов *adhE1a KO* и *adhE1b KO* на фруктозе характеризовался несколько более длинной лаг-фазой, чем ДТ, но клетки в конечном итоге выросли до аналогичной OD600 (фиг. 14). Напротив, конечная OD600 штамма *adhE2 KO* была на 28% ниже, чем ДТ (значение $p<0,0001$) (фиг. 14). Даже после 13 суток инкубации в культуре штамма *adhE2 KO* было обнаружено 0,92 г/л фруктозы, тогда как все остальные штаммы полностью исчерпали субстрат до 3 суток (данные не показаны). Все три штамма *adhE KO* достигли пиковых уровней ацетата 72,2-76,5 мМ, что на 31-43% выше, чем ДТ (значения $p<0,05$) (фиг. 14). По сравнению с ДТ оба штамма *adhE1 KO* продуцировали аналогичные количества этанола, но штамм *adhE2 KO* генерировал только 37% титров этанола ДТ (значение $p=0,0035$) (фиг. 14). Все три штамма *adhE KO* продуцировали менее половины 2,3-бутандиола, зарегистрированного в культуре ДТ (значения $p<0,05$) (фиг. 14).

В этом примере был построен генетически стабильный IFD штамм *adhE1* (лишенный *Ald*- и *Adh*-доменов), который потерял IFD плазмиду. Однако непреднамеренная делеция 84 б.п. в межгенной области между *adhE1* и *adhE2* в штамме *C. autoethanogenum* Δ *adhE1mut* случайно удалила терминатор транскрипции и промотор *adhE2*, что привело к появлению штамма Δ *adhE1mut*. По сравнению с исходным штаммом (контроль Δ *rugE*) рост штамма Δ *adhE1mut* имел более длительную лаг-фазу, но оба штамма достигли аналогичной конечной плотности клеток в присутствии фруктозы (фиг. 15). Оба штамма продуцировали эквивалентные количества ацетата (фиг. 15), этанола (фиг. 15) и 2,3-бутандиола (данные не показаны).

Возможно, что незатронутый промотор *adhE1* может опосредовать экспрессию *adhE2* в результате

этой перегруппировки. Чтобы проверить эту гипотезу, сравнивали уровни мРНК *adhE2* в исходном штамме и штамме *ΔadhE1mut*. Выращенные на фруктозе клетки собирали в ранней экспоненциальной фазе, поздней экспоненциальной фазе и стационарной фазе. РНК экстрагировали и генерировали кДНК. Анализ экспрессии генов показал, что уровень транскрипции *adhE2* исходного штамма был стабильным во всех трех временных точках (разница менее 3,2 раза) (фиг. 15). Напротив, уровни мРНК *adhE2* в штамме *ΔadhE1mut* проявляли большие флуктуации с начальным уменьшением в 114 раз от ранней экспоненциальной фазы роста до поздней фазы экспоненциального роста с последующим 16-кратным увеличением в стационарной фазе роста (фиг. 15). Более того, уровни транскрипции *adhE2* в штамме *ΔadhE1mut* также были значительно выше (в 15-1359 раз), чем в клетках исходного штамма во всех трех временных точках выборки (значение $p < 0,05$) (фиг. 15). При ауотрофном росте на $H_2 + CO_2$ *adhE1* умеренно экспрессируется (61 ФРКМ), тогда как *adhE2* почти не экспрессируется (0,4 ФРКМ) в *S. autoethanogenum* (Mock et al., 2015).

Вывод о том, что образование этанола у всех трех штаммов с инактивацией *adhE1* (*adhE1a KO*, *adhE1b KO* и *ΔadhE1mut*) не нарушается при гетеротрофном росте, противоречит результатам Leang et al. (2013), которые показали, что делеция *adhE1* (но не *adhE2*) *S. ljungdahlii* приводила к образованию штамма, который продуцировал в 6 раз меньше этанола, чем контроль ДТ. Кроме того, результаты в *S. autoethanogenum* показали, что инактивация *adhE2* генерировала на 63% более низкую концентрацию этанола, чем ДТ. Одним отличием в методологии эксперимента выращивания является использование 10 г/л фруктозы в этой работе, но 5 г/л фруктозы в исследовании Leang et al. (2013). Эксперименты по сивкенированию РНК как у *S. autoethanogenum* (Marcellin et al., 2016), так и у *S. ljungdahlii* (Nagarajan et al., 2013; Tan et al., 2013) показали, что *adhE1* транскрибируется на значительно более высоких уровнях при выращивании на фруктозе по сравнению с автотрофным ростом, что говорит о важности этого гена в гетеротрофных условиях.

Сравнение последовательностей аминокислот (АА) *AdhE1* и *AdhE2* между *S. autoethanogenum* и *S. ljungdahlii* показывает, что существует три замены в *AdhE1* и восемь замен в *AdhE2*. Одно из изменений АА в *AdhE2* происходит в сайте связывания NADH домена *Adh*. Возможно, что одна из этих подстановок приводит к модификации специфичности субстрата и кофактора, о чем свидетельствует изменение кофактора с NADH на NADPH в *AdhE* *S. thermocellum* благодаря одному изменению АА в Fe-*Adh* домене (Brown et al., 2011). Ожидается, что изменение кофакторной специфичности окажет значительное влияние на потоки электронов и углерода, поскольку NADH обычно используется в катаболических реакциях, тогда как NADPH обычно используется в качестве восстановителя в анаболических процессах (Alberts et al., 2002). Другим возможным объяснением противоречивых фенотипов является то, что *S. autoethanogenum* может обладать другими этанологенными ферментами, которые компенсируют потерю активности *AdhE* во время роста на фруктозе.

1.15. Инактивация любой *adhE* *snjqrj* увеличивает ацетогенное продуцирование этанола.

Обычные стратегии, направленные на усиление продуцирования этанола, обычно используют введение или сверхэкспрессию *AdhE* (Peng et al., 2008; Thapa et al., 2015; Yao and Mikkelsen, 2010). Однако учитывая уникальные условия недостатка АТФ присутствующие при ацетогенном росте, и наличие этанологенного *Aog* в ацетогенах, таких как *S. autoethanogenum*, было высказано предположение, что инактивация *adhE* может перенаправлять углерод и восстанавливающие эквиваленты в направлении образования ацетата с образованием АТФ. Уксусная кислота может быть восстановлена до ацетальдегида (через *Aog* и восстановленные ферредоксины), а затем до этанола через NAD(P)H-зависимый *Adh* (фиг. 1).

Во время роста на чистом CO все три штамма *adhE KO* (*adhE1a*, *adhE1b* и *adhE2*) проявляли значительные неполноценности роста в виде продолжительной лаг-фазы и на 47-55% более низкой плотности клеток, чем ДТ (значения $p < 0,01$) (фиг. 16), что говорит о неэффективности повторного использования восстанавливающих эквивалентов. Несмотря на низкую биомассу, все три штамма *adhE KO* стойко выработывали титры этанола на 154-183% выше при выращивании на CO. В частности, штамм *adhE1a KO* продуцировал 53,4 Мм этанола, на 183% больше, чем ДТ (значение $p = 0,0005$). Штамм *adhE1b KO* продуцировал на 171% больше этанола (статистически не значимо) и штамм *adhE2 KO* продуцировал на 154% больше этанола, чем ДТ (значение $p = 0,021$) (фиг. 16). Эти существенные улучшения в продуцировании этанола были частично сбалансированы уменьшением в титрах 2,3-бутандиола на 48-68% (значения $p < 0,004$) (фиг. 16). Учитывая сходство фенотипов между штаммом *adhE1a KO* и штаммом *adhE1b KO*, положение вставки *Clostron* в *adhE1* (в *Ald*-домене или в *Adh*-домене) сыграло несущественную роль в общем фенотипе мутанта.

В штамме *ΔadhE1mut* усиленная экспрессия *adhE2* может компенсировать потерю активности *AdhE1*. В соответствии с этой гипотезой, по сравнению с обоими штаммами *adhE1a* и *adhE1b KO*, штамм *ΔadhE1mut* проявлял более мягкий дефект роста и генерировал аналогичные количества ацетата и 2,3-бутандиола в качестве исходного штамма при выращивании на чистом CO (фиг. 17). С фенотипом повышенного продуцирования этанола в условиях присутствия CO согласовалась генерация на 27% большего количества этанола (статистически не значимо) штаммом *ΔadhE1mut* в сравнении с исходным штаммом, что менее значимо, чем увеличение на 171-183%, зафиксированное для штаммов *adhE1a* и

adhE1b KO.

Заметное увеличение продуцирования этанола, проявляемое штаммами с инактивированной adhE при выращивании на CO, согласуется с гипотезой о том, что путь АТФ-эффективного, непрямого образования этанола с использованием Aog является более благоприятным для ацетогенного биосинтеза этанола. В качестве дополнительного доказательства, штамм двойного KO aog1+2 генерировал только 54% этанола от количества этанола достигнутого ДТ при тех же условиях роста. Mock et al. (2015) предположили, что связанная с CoA активность ацетальдегиддегидрогеназы, детектированная в выращиваемом на H₂+CO₂ C. autoethanogenum, физиологически только облегчает повторное использование образовавшегося этанола. Предполагается, что при высокой концентрации этанола и низкой концентрации H₂ окисление этанола до ацетил-CoA связано с восстановлением 2CO₂ до ацетата (Mock et al., 2015). В поддержку этого мнения ДТ C. autoethanogenum, растущий на H₂+CO₂, временно продуцировал 10,3 мМ этанола при экспоненциальном росте, но после этого в течение стационарной фазы наблюдалось резкое снижение до 1,8 мМ. В дополнение к двум генам adhE в геноме C. autoethanogenum имеются 3 других монофункциональных гена ald (CAETHG_1819, 1830 и 3287). Соответственно генерация тройного ald KO штамма может дополнительно направлять углерод и электроны в направлении синтеза ацетата и образования этанола через Aog.

Все ссылки, включая публикации, заявки на патенты и патенты, приведенные в данном документе, включены в данный документ посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая ссылка была индивидуально и конкретно указана для включения в качестве ссылки и была изложена в данном документе полностью. Ссылка на любой уровень техники в этом описании не является и не должна восприниматься как признание того, что предшествующий уровень техники образует часть общих обычных знаний в этой области деятельности в любой стране.

Использование форм единственного числа и подобных референтов в контексте описания данного изобретения (особенно в контексте следующей далее формулы изобретения) должно толковаться как единственное, так и как множественное число, если только иначе не обозначено в данном документе или это явно противоречит контексту. Термины "содержащий", "имеющий", "включающий" и "вмещающий" должны толковаться как открытые термины (т.е. означают "включая, но не ограничиваясь"), если не указано иное. Вычисление диапазонов значений в данном документе просто предназначено для использования в качестве сокращенного метода для индивидуального обращения к каждому отдельному значению, попадающему в диапазон, если в данном документе не указано иначе, и каждое отдельное значение включено в спецификацию, как если бы оно было отдельно представлено в данном документе. Все описанные в данном документе способы могут быть выполнены в любом подходящем порядке, если иное не указано в данном документе или иначе явно противоречит контексту. Использование любых и всех примеров или иллюстративного языка (например, "такой как"), приведенное в данном документе, предназначено просто для лучшего освещения изобретения и не предлагает ограничение объема изобретения, если не заявлено иное. Никакие выражения в спецификации не должны толковаться как указывающие на какой-либо не заявленный элемент как существенный для практики изобретения. Предпочтительные варианты осуществления дпного изобретения описаны в данном документе. Вариации этих предпочтительных вариантов осуществления могут стать очевидными для специалистов в данной области техники после прочтения вышеприведенного описания. Изобретатели ожидают, что квалифицированные специалисты соответствующим образом применят такие вариации, и изобретатели подразумевали, что данное изобретение будет практиковаться и путями отличными от специфически описанных в данном документе. Соответственно данное изобретение включает все модификации и эквиваленты предметов и способов изобретения, указанных в формуле изобретения, прилагаемой к данному документу, как это разрешено применимым законодательством. Более того, любая комбинация вышеописанных элементов во всех возможных вариациях охвачена изобретением, если иное не указано в данном документе или иначе явно противоречит контексту.

Список литературы.

1. Abrini, J., Naveau, H., Nyns, E. J., 1994. *Clostridium autoethanogenum*, sp. nov., an anaerobic bacterium that produces ethanol from carbon monoxide. *Archives of Microbiology*. 161, 345-351.
2. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., 2002. *Catalysis and the use of energy by cells. Molecular Biology of The Cell*. Garland Science, New York.
3. Arnau, J., Jørgensen, F., Madsen, S. M., Vrang, A., Israelsen, H., 1998. Cloning of the *Lactococcus lactis* adhE gene, encoding a multifunctional alcohol dehydrogenase, by complementation of a fermentative mutant of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 180, 3049-3055.
4. Banerjee, A., Leang, C., Ueki, T., Nevin, K. P., Lovley, D. R., 2014. Lactose-inducible system for metabolic engineering of *Clostridium ljungdahlii*. *Applied and Environmental Microbiology*. 80, 2410-2416.
5. Basen, M., Schut, G. J., Nguyen, D. M., Lipscomb, G. L., Benn, R. A., Prybol, C. J., Vaccaro, B. J., Poole, F. L., Kelly, R. M., Adams, M. W. W., 2014. Single gene insertion drives bioalcohol production by a thermophilic archaeon. *PNAS USA*. 111, 17618-17623.
6. Bertram, J., Dürre, P., 1989. Conjugal transfer and expression of streptococcal transposons in *Clostridium acetobutylicum*. *Archives of Microbiology*. 151, 551-557.
7. Brown, S. D., Guss, A. M., Karpinets, T. V., Parks, J. M., Smolin, N., Yang, S., Land, M. L., Klingeman, D. M., Bhandiwad, A., Rodriguez, M., Raman, B., Shao, X., Mielenz, J. R., Smith, J. C., Keller, M., Lynd, L. R., 2011. Mutant alcohol dehydrogenase leads to improved ethanol tolerance in *Clostridium thermocellum*. *PNAS USA*. 108, 13752-7.
8. Brown, S. D., Nagaraju, S., Utturkar, S., De Tissera, S., Segovia, S., Mitchell, W., Land, M. L., Dassanayake, A., Köpke, M., 2014. Comparison of single-molecule sequencing and hybrid approaches for finishing the genome of *Clostridium autoethanogenum* and analysis of CRISPR systems in industrial relevant Clostridia. *Biotechnology for Biofuels*. 7, 1-18.

9. Bruant, G., Lévesque, M.-J., Peter, C., Guiot, S. R., Masson, L., 2010. Genomic analysis of carbon monoxide utilization and butanol production by *Clostridium carboxidivorans* strain P7. *PloS one*. 5, e13033.
10. Chan, M. K., Mukund, S., Kletzin, A., Adams, M. W., Rees, D. C., 1995. Structure of a hyperthermophilic tungstopterin enzyme, aldehyde ferredoxin oxidoreductase. *Science*. 267, 1463-1469.
11. Chen, M., Li, E., Stanley, S. L., Jr., 2004. Structural analysis of the acetaldehyde dehydrogenase activity of *Entamoeba histolytica* alcohol dehydrogenase 2 (EhADH2), a member of the ADHE enzyme family. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 137, 201-5.
12. Ehsaan, M., Kuit, W., Zhang, Y., Cartman, S. T., Heap, J. T., Winzer, K., Minton, N. P., 2016. Mutant generation by allelic exchange and genome resequencing of the biobutanol organism *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Biotechnology for Biofuels*. 9, 1-20.
13. Espinosa, A., Yan, L., Zhang, Z., Foster, L., Clark, D., Li, E., Stanley, S. L., Jr., 2001. The bifunctional *Entamoeba histolytica* alcohol dehydrogenase 2 (EhADH2) protein is necessary for amebic growth and survival and requires an intact C-terminal domain for both alcohol dehydrogenase and acetaldehyde dehydrogenase activity. *Journal of Biological Chemistry*. 276, 20136-43.
14. Extance, J., Crennell, S. J., Eley, K., Cripps, R., Hough, D. W., Danson, M. J., 2013. Structure of a bifunctional alcohol dehydrogenase involved in bioethanol generation in *Geobacillus thermoglucosidasius*. *Acta Crystallography. Section D, Biological Crystallography*. vol. 69, United States, pp. 2104-15.
15. Fast, A. G., Papoutsakis, E. T., 2012. Stoichiometric and energetic analyses of non-photosynthetic CO₂-fixation pathways to support synthetic biology strategies for production of fuels and chemicals. *Current Opinion in Chemical Engineering*. 1, 380-395.
16. Fontaine, L., Meynial-salles, I., Girbal, L., Yang, X., Croux, C., Soucaille, P., 2002. Molecular characterization and transcriptional analysis of *adhE2*, the gene encoding the NADH-dependent aldehyde/alcohol dehydrogenase responsible for butanol production in alcohologenic cultures of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Journal of Bacteriology*. 184, 821-830.

17. Genthner, B. R. S., Davis, C. L., Bryant, M. P., 1981. Features of rumen and sewage sludge strains of *Eubacterium limosum*, a methanol-utilizing and H₂-CO₂-utilizing species. *Applied and Environmental Microbiology*. 42, 12-19.
18. Gössner, A. S., Picardal, F., Tanner, R. S., Drake, H. L., 2008. Carbon metabolism of the moderately acid-tolerant acetogen *Clostridium drakei* isolated from peat. *FEMS Microbiology Letters*. 287, 236-42.
19. Heap, J. T., Ehsaan, M., Cooksley, C. M., Ng, Y. K., Cartman, S. T., Winzer, K., Minton, N. P., 2012. Integration of DNA into bacterial chromosomes from plasmids without a counter-selection marker. *Nucleic Acids Research*. 40, e59.
20. Heap, J. T., Kuehne, S. a., Ehsaan, M., Cartman, S. T., Cooksley, C. M., Scott, J. C., Minton, N. P., 2010. The Clostron: Mutagenesis in *Clostridium* refined and streamlined. *Journal of Microbiological Methods*. 80, 49-55.
21. Heap, J. T., Pennington, O. J., Cartman, S. T., Carter, G. P., Minton, N. P., 2007. The Clostron: A universal gene knock-out system for the genus *Clostridium*. *Journal of Microbiological Methods*. 70, 452-464.
22. Heap, J. T., Pennington, O. J., Cartman, S. T., Minton, N. P., 2009. A modular system for *Clostridium* shuttle plasmids. *Journal of Microbiological Methods*. 78, 79-85.
23. Humphreys, C. M., McLean, S., Schatschneider, S., Millat, T., Henstra, A. M., Annan, F. J., Breitkopf, R., Pander, B., Piatek, P., Rowe, P., Wichlacz, A. T., Woods, C., Norman, R., Blom, J., Goesman, A., Hodgman, C., Barrett, D., Thomas, N. R., Winzer, K., Minton, N. P., 2015. Whole genome sequence and manual annotation of *Clostridium autoethanogenum*, an industrially relevant bacterium. *BMC Genomics*. 16, 1-10.
24. Isom, C. E., Nanny, M. A., Tanner, R. S., 2015. Improved conversion efficiencies for n-fatty acid reduction to primary alcohols by the solventogenic acetogen "*Clostridium ragsdalei*". *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 42, 29-38.
25. Krumholz, L. R., Bryant, M. P., 1985. *Clostridium pfennigii* sp nov uses methoxyl groups of monobenzenoids and produces butyrate. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 35, 454-456.
26. Köpke, M., Gerth, M. L., Maddock, D. J., Mueller, A. P., Liew, F., Simpson, S. D., Patrick, W. M., 2014. Reconstruction of an acetogenic 2,3-butanediol pathway

- involving a novel NADPH-dependent primary-secondary alcohol dehydrogenase. *Applied and Environmental Microbiology*. 80, 3394-3303.
27. Köpke, M., Held, C., Hujer, S., Liesegang, H., Wiezer, A., Wollherr, A., Ehrenreich, A., Liebl, W., Gottschalk, G., Dürre, P., 2010. *Clostridium ljungdahlii* represents a microbial production platform based on syngas. *PNAS USA*. 107, 13087-13092.
28. Köpke, M., Mihalcea, C., Liew, F. M., Tizard, J. H., Ali, M. S., Conolly, J. J., Al-Sinawi, B., Simpson, S. D., 2011. 2,3-butanediol production by acetogenic bacteria, an alternative route to chemical synthesis, using industrial waste gas. *Applied and Environmental Microbiology*. 77, 5467-5475.
29. Küsel, K., Dorsch, T., Acker, G., Stackebrandt, E., Drake, H. L., 2000. *Clostridium scatologenes* strain SL1 isolated as an acetogenic bacterium from acidic sediments. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 50 Pt 2, 537-546.
30. Leang, C., Ueki, T., Nevin, K. P., Lovley, D. R., 2013. A genetic system for *Clostridium ljungdahlii*: A chassis for autotrophic production of biocommodities and a model homoacetogen. *Applied and Environmental Microbiology*. 79, 1102-1109.
31. Liu, J., Tan, Y., Yang, X., Chen, X., Li, F., 2013. Evaluation of *Clostridium ljungdahlii* DSM 13528 reference genes in gene expression studies by qRT-PCR. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 116, 460-464.
32. Lo, J., Zheng, T., Hon, S., Olson, D. G., Lynd, L. R., 2015. The bifunctional alcohol and aldehyde dehydrogenase gene, *adhE*, is necessary for ethanol production in *Clostridium thermocellum* and *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*. *Journal of Bacteriology*. 197, 1386-93.
33. Loach, P. A., 1976. Oxidation-reduction potentials, absorbance bands and molar absorbance of compounds used in biochemical studies. In: Fasman, G. D., (Ed.), *Handbook of biochemistry and molecular biology*. vol. 1. CRC Press, Cleveland, pp. 122 - 130.
34. Marcellin, E., Behrendorff, J. B., Nagaraju, S., DeTissera, S., Segovia, S., Palfreyman, R., Daniell, J., Licona-Cassani, C., Quek, L.-e., Speight, R., Hodson, M. P., Simpson, S. D., Mitchell, W. P., Köpke, M., Nielsen, L. K., 2016. Low carbon fuels and commodity chemicals from waste gases - Systematic approach to understand energy metabolism in a model acetogen. *Green Chemistry*.
35. Membrillo-Hernandez, J., Echave, P., Cabisco, E., Tamarit, J., Ros, J., Lin, E. C., 2000. Evolution of the *adhE* gene product of *Escherichia coli* from a functional

- reductase to a dehydrogenase. Genetic and biochemical studies of the mutant proteins. *Journal of Biological Chemistry*. 275, 33869-75.
36. Mock, J., Zheng, Y., Mueller, A. P., Ly, S., Tran, L., Segovia, S., Nagaraju, S., Köpke, M., Dürre, P., Thauer, R. K., 2015. Energy conservation associated with ethanol formation from H₂ and CO₂ in *Clostridium autoethanogenum* involving electron bifurcation. *Journal of Bacteriology*. 197, 2965-2980.
37. Nagarajan, H., Sahin, M., Nogales, J., Latif, H., Lovley, D., Ebrahim, A., Zengler, K., 2013. Characterizing acetogenic metabolism using a genome-scale metabolic reconstruction of *Clostridium ljungdahlii*. *Microbial Cell Factories*. 12, 118.
38. Ng, Y. K., Ehsaan, M., Philip, S., Collery, M. M., Janoir, C., Collignon, A., Cartman, S. T., Minton, N. P., 2013. Expanding the repertoire of gene tools for precise manipulation of the *Clostridium difficile* genome: Allelic exchange using pyrE alleles. *Plos One*. 8.
39. Peng, H., Wu, G. G., Shao, W. L., 2008. The aldehyde/alcohol dehydrogenase (AdhE) in relation to the ethanol formation in *Thermoanaerobacter ethanolicus* JW200. *Anaerobe*. 14, 125-127.
40. Perez, J. M., Richter, H., Loftus, S. E., Angenent, L. T., 2013. Biocatalytic reduction of short-chain carboxylic acids into their corresponding alcohols with syngas fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*. 110, 1066-77.
41. Perutka, J., Wang, W., Goerlitz, D., Lambowitz, A. M., 2004. Use of computer-designed group II introns to disrupt *Escherichia coli* DExH/D-box protein and DNA helicase genes. *Journal of Molecular Biology*. 336, 421-439.
42. Poehlein, A., Schmidt, S., Kaster, A. K., Goenrich, M., Vollmers, J., Thurmer, A., Bertsch, J., Schuchmann, K., Voigt, B., Hecker, M., Daniel, R., Thauer, R. K., Gottschalk, G., Müller, V., 2012. An ancient pathway combining carbon dioxide fixation with the generation and utilization of a sodium ion gradient for ATP synthesis. *Plos One*. 7.
43. Purdy, D., O'Keeffe, T. A. T., Elmore, M., Herbert, M., McLeod, A., Bokori-Brown, M., Ostrowski, A., Minton, N. P., 2002. Conjugative transfer of clostridial shuttle vectors from *Escherichia coli* to *Clostridium difficile* through circumvention of the restriction barrier. *Molecular Microbiology*. 46, 439-452.
44. Sambrook, J., Russell, D. W., 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

45. Tan, Y., Liu, J. J., Chen, X. H., Zheng, H. J., Li, F. L., 2013. RNA-seq-based comparative transcriptome analysis of the syngas-utilizing bacterium *Clostridium ljungdahlii* DSM 13528 grown autotrophically and heterotrophically. *Molecular Biosystems*. 9, 2775-2784.
46. Thapa, L. P., Lee, S. J., Yang, X., Lee, J. H., Choi, H. S., Park, C., Kim, S. W., 2015. Improved bioethanol production from metabolic engineering of *Enterobacter aerogenes* ATCC 29007. *Process Biochemistry*.
47. Thauer, R. K., Jungermann, K., Decker, K., 1977. Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriological Reviews*. 41, 100-180.
48. Utturkar, S. M., Klingeman, D. M., Bruno-Barcena, J. M., Chinn, M. S., Grunden, A. M., Köpke, M., Brown, S. D., 2015. Sequence data for *Clostridium autoethanogenum* using three generations of sequencing technologies. *Scientific Data*. 2, 1-9.
49. Wang, S., Huang, H., Kahnt, H. H., Mueller, A. P., Köpke, M., Thauer, R. K., 2013. NADP-specific electron-bifurcating [FeFe]-hydrogenase in a functional complex with formate dehydrogenase in *Clostridium autoethanogenum* grown on CO. *Journal of Bacteriology*. 195, 4373-4386.
50. Warrens, A. N., Jones, M. D., Lechlera, R. I., 1997. Splicing by overlap extension by PCR using asymmetric amplification: an improved technique for the generation of hybrid proteins of immunological interest. *Gene*. 186, 29-35.
51. Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* 173:697-703.
52. Williams, D. R., Young, D. I., Young, M., 1990. Conjugative plasmid transfer from *Escherichia coli* to *Clostridium acetobutylicum*. *Journal of General Microbiology*. 136, 819-826.
53. Yao, S., Mikkelsen, M. J., 2010. Identification and overexpression of a bifunctional aldehyde/alcohol dehydrogenase responsible for ethanol production in *Thermoanaerobacter mathranii*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 19, 123-133.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Не встречающаяся в природе C1-фиксирующая бактерия *Clostridia*, имеющая сниженную или устраненную активность альдегид:ферредоксин оксидоредуктазы, которая катализирует реакцию, определяемую ЕС 1.2.7.5, по сравнению с исходной бактерией, где указанная не встречающаяся в природе бактерия потребляет газообразный субстрат, содержащий один или большее количество из CO, CO₂ и H₂, и где указанная не встречающаяся в природе бактерия содержит по меньшей мере одну разрушающую мутацию в гене, кодирующем альдегид:ферредоксин оксидоредуктазу.

2. Бактерия по п.1, отличающаяся тем, что указанная не встречающаяся в природе бактерия дополнительно имеет уменьшенную или устраненную активность по меньшей мере одного фермента, который катализирует реакцию, определяемую ЕС 1.2.1.10 и/или ЕС 1.1.1.1, по сравнению с исходной бактерией.

3. Бактерия по п.2, отличающаяся тем, что указанная не встречающаяся в природе бактерия содержит по меньшей мере одну разрушающую мутацию в гене, кодирующем фермент, который катализирует реакцию, определяемую ЕС 1.2.1.10 и/или ЕС 1.1.1.1.

4. Бактерия по п.2, отличающаяся тем, что фермент, который катализирует реакцию, определяемую ЕС 1.2.1.10 и/или ЕС 1.1.1.1, выбран из группы, состоящей из бифункциональной альдегид/алкогольдегидрогеназы, альдегиддегидрогеназы и алкогольдегидрогеназы.

5. Бактерия по п.1, отличающаяся тем, что указанная не встречающаяся в природе бактерия продуцирует продукт, выбранный из группы, состоящей из ацетил-СоА, ацетоацетил-СоА, ацетоацетата, ацетона, изопропанола, 3-гидроксиизовалерил-СоА, 3-гидроксиизовалерата, изобутилена, изопрена, 3-гидроксибутирил-СоА, 3-гидроксибутирата, 3-гидроксибутирилового альдегида, 1,3-бутандиола, 2-гидроксиизобутирил-СоА, 2-гидроксиизобутирата, пирувата, ацетолактата, ацетоина, 2,3-бутандиола и лактата.

6. Бактерия по п.1, отличающаяся тем, что исходная бактерия выбрана из группы, состоящей из *Clostridium aceticum*, *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium carboxidivorans*, *Clostridium coskatii*, *Clos-*

tridium drakei, *Clostridium formicoaceticum*, *Clostridium ljungdahlii* и *Clostridium ragsdalei*.

7. Способ производства продукта путем культивирования не встречающейся в природе C1-фиксирующей бактерии по п.1 в присутствии газообразного субстрата, содержащего один или большее количество из CO, CO₂ и H₂.

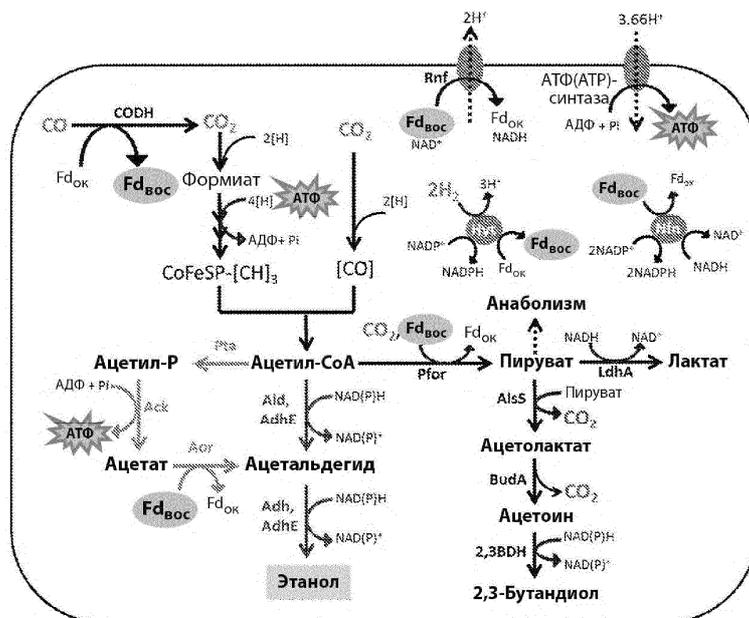
8. Способ по п.7, в котором не встречающаяся в природе C1-фиксирующая бактерия дополнительно имеет уменьшенную или устраненную активность по меньшей мере одного фермента, который катализирует реакцию, определяемую ЕС 1.2.1.10 и/или ЕС 1.1.1.1, по сравнению с исходной бактерией.

9. Способ по п.8, в котором не встречающаяся в природе C1-фиксирующая бактерия содержит по меньшей мере одну разрушающую мутацию в гене, кодирующем фермент, который катализирует реакцию, определяемую ЕС 1.2.1.10 и/или ЕС 1.1.1.1.

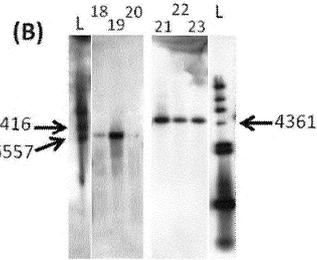
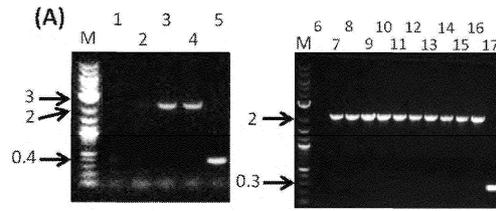
10. Способ по п.8, в котором фермент, который катализирует реакцию, определяемую ЕС 1.2.1.10 и/или ЕС 1.1.1.1, выбран из группы, состоящей из бифункциональной альдегид/алкогольдегидрогеназы, альдегиддегидрогеназы и алкогольдегидрогеназы.

11. Способ по п.7, в котором указанный продукт представляет собой продукт, являющийся производным от ацетил-СоА, выбранный из группы, состоящей из ацетил-СоА, ацетоацетил-СоА, ацетоацетата, ацетона, изопропанола, 3-гидроксиизовалерил-СоА, 3-гидроксиизовалерата, изобутилена, изопрена, 3-гидроксипропирил-СоА, 3-гидроксипропирилата, 3-гидроксипропирилового альдегида, 1,3-бутандиола, 2-гидроксиизобутирил-СоА, 2-гидроксиизобутирата, пирувата, ацетолактата, ацетоина, 2,3-бутандиола и лактата.

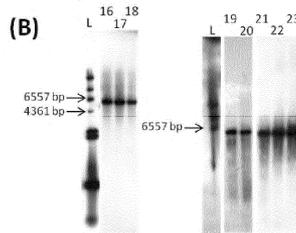
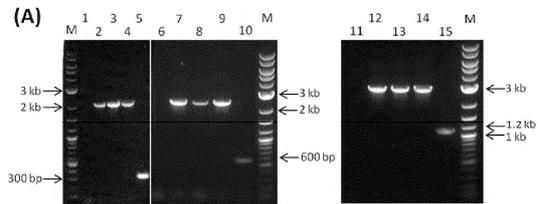
12. Способ по п.7, в котором исходная бактерия выбрана из группы, состоящей из *Clostridium acetivorum*, *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium carboxidivorans*, *Clostridium coskatii*, *Clostridium drakei*, *Clostridium formicoaceticum*, *Clostridium ljungdahlii* и *Clostridium ragsdalei*.



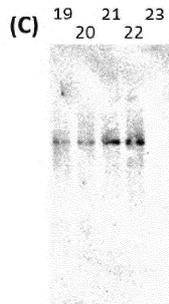
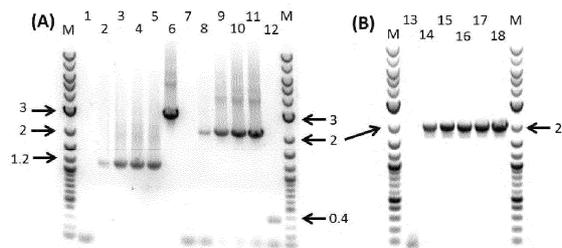
Фиг. 1



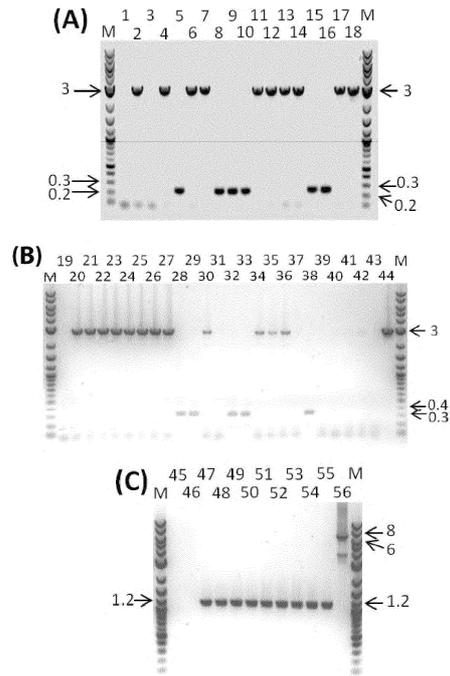
Фиг. 2



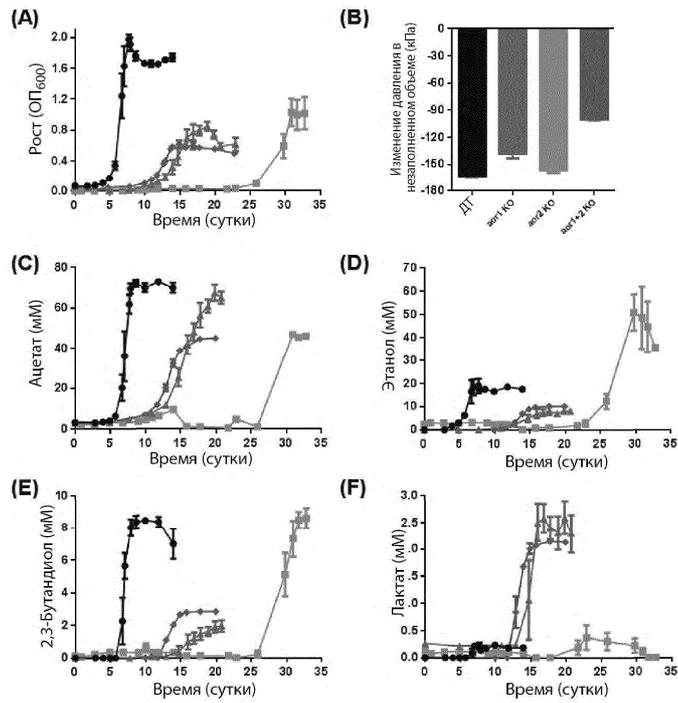
Фиг. 3



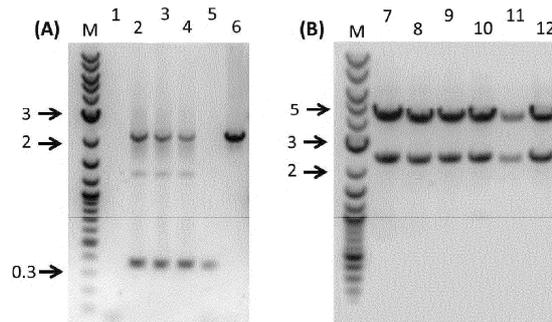
Фиг. 4



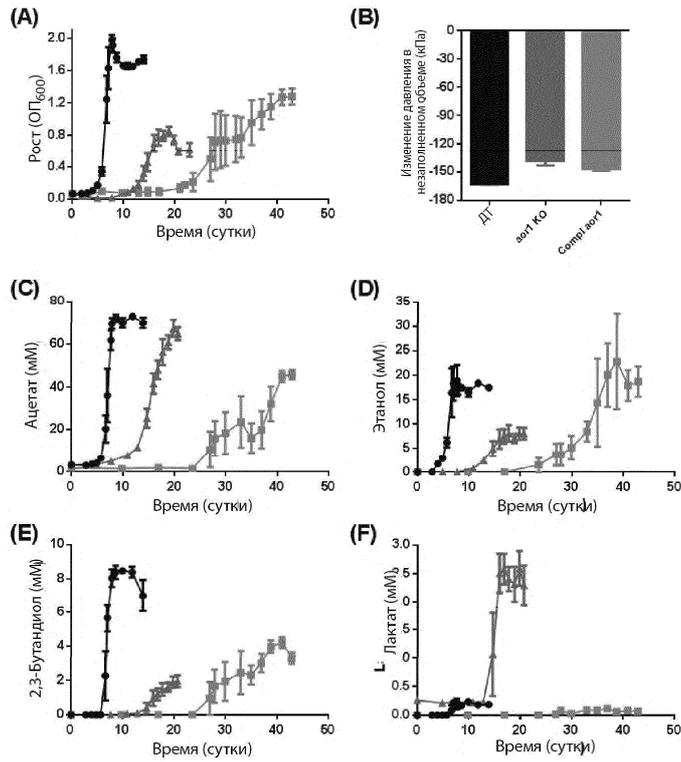
Фиг. 5



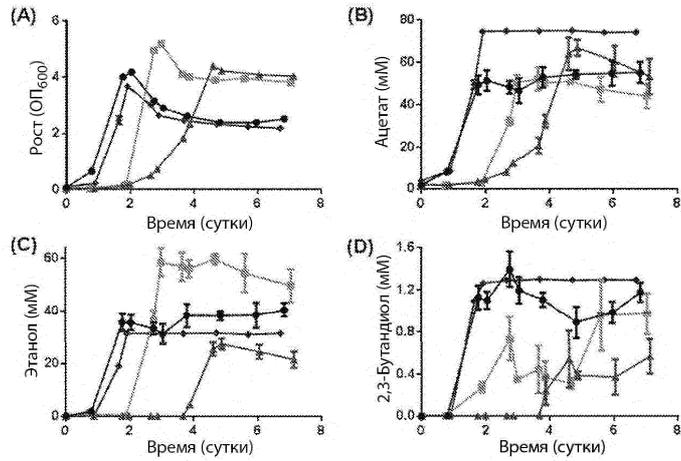
Фиг. 6



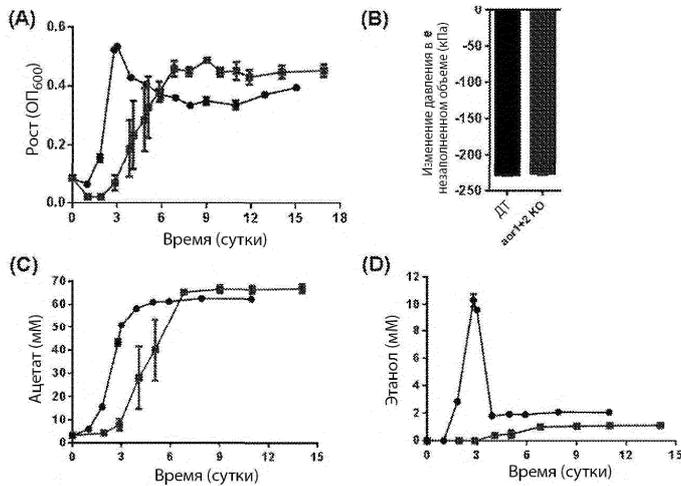
Фиг. 7



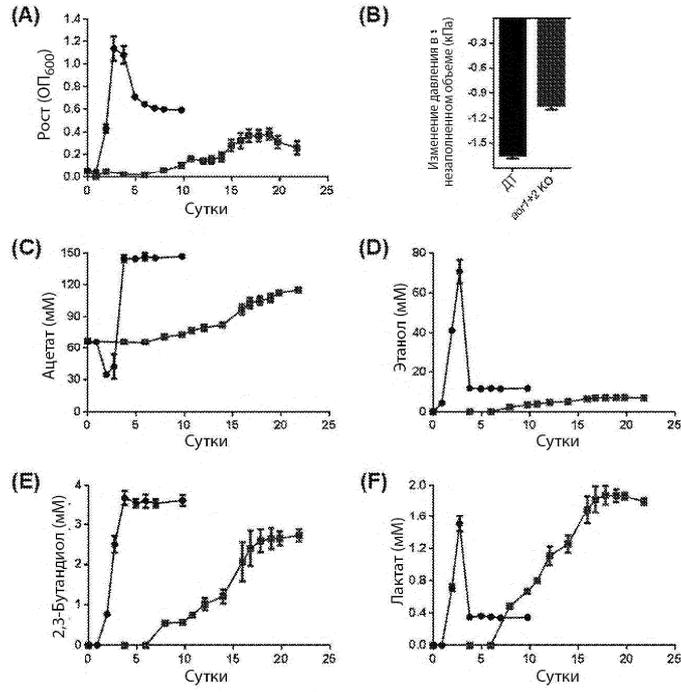
Фиг. 8



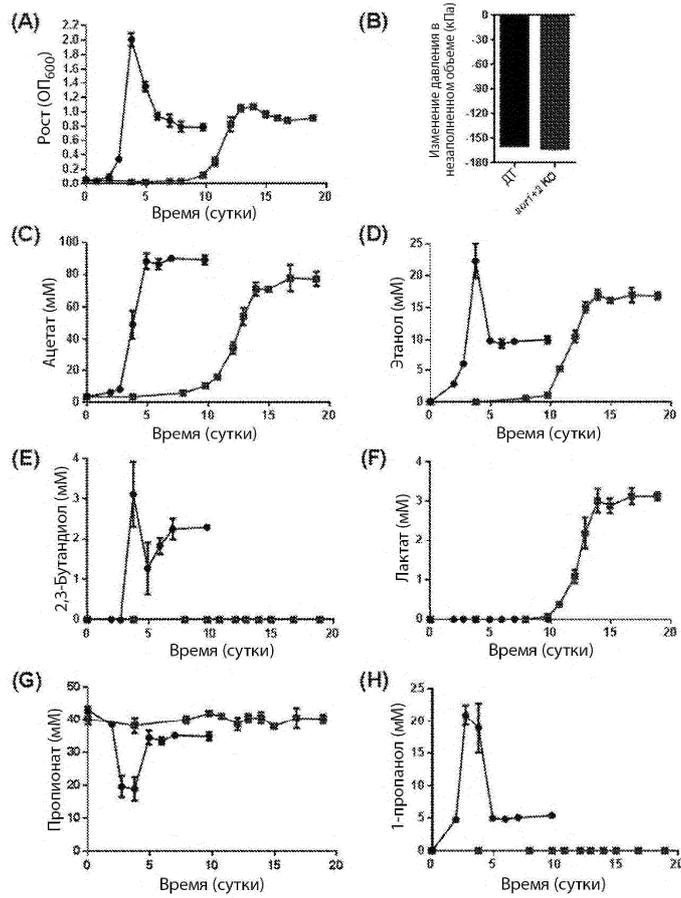
Фиг. 9



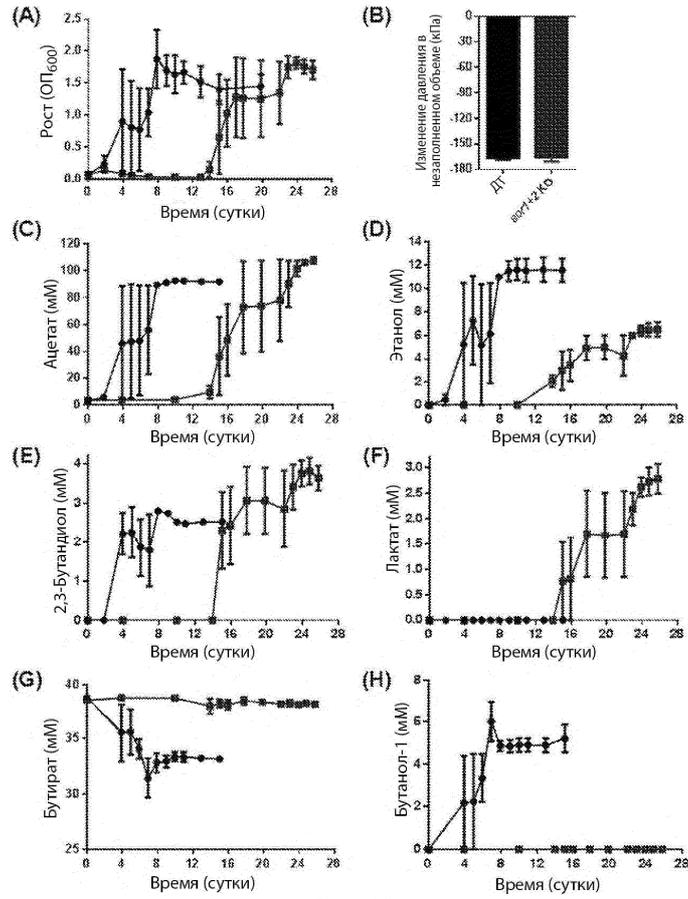
Фиг. 10



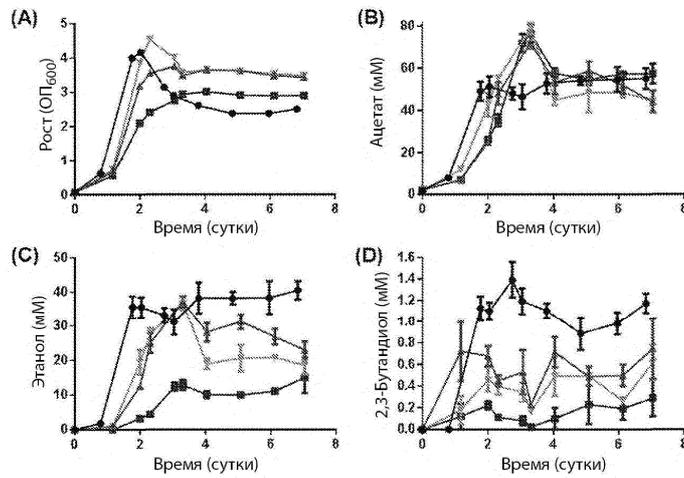
Фиг. 11



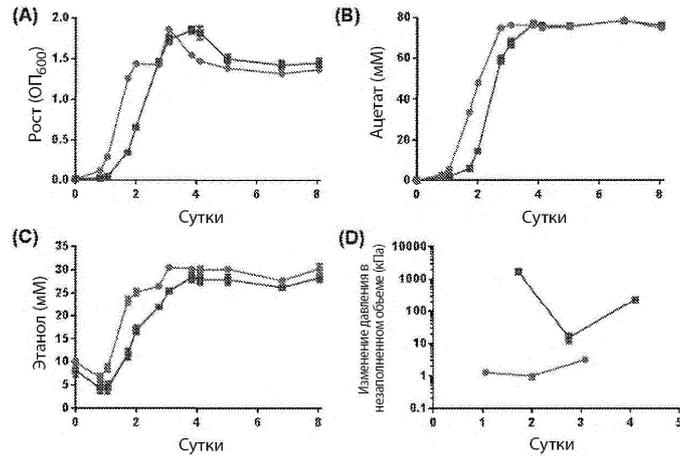
Фиг. 12



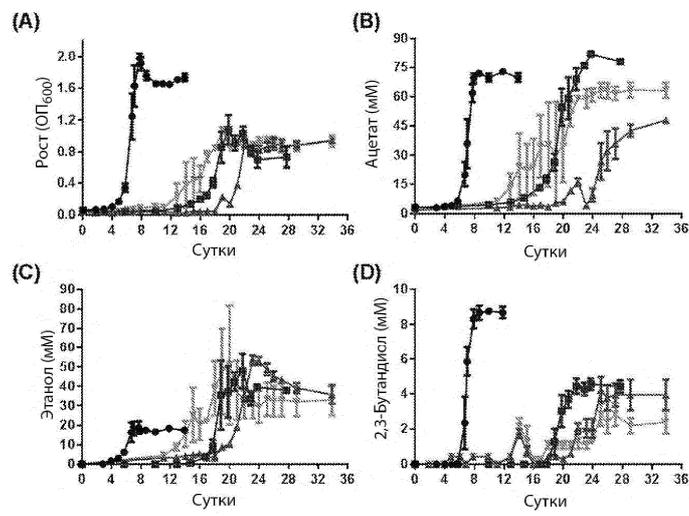
Фиг. 13



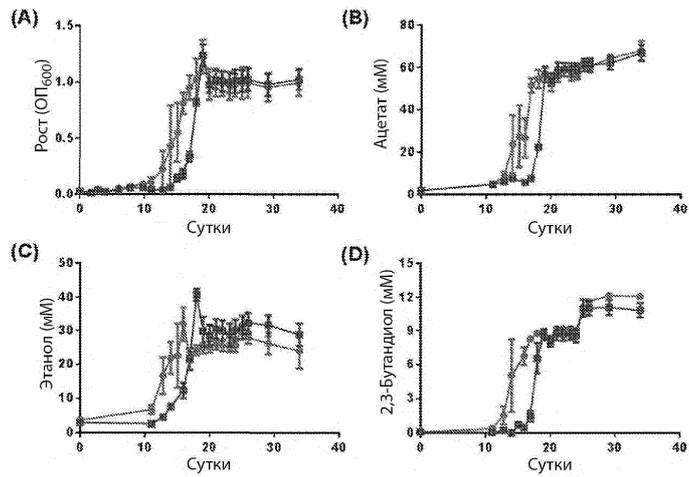
Фиг. 14



Фиг. 15



Фиг. 16



Фиг. 17

